

Mestrado Integrado em Medicina Dentária

# **Cancro Oral – O Papel dos microRNA's na Detecção Precoce e Terapêutica**

Maria Luís Ferreira Rios de Lacerda

**Orientadora:** Paula Cristina dos Santos Vaz Fernandes

**Co-Orientador:** Filipe Poças de Almeida Coimbra



**Porto**

2013



# **Cancro Oral – O Papel dos microRNA's na Detecção Precoce e Terapêutica**

Maria Luís Ferreira Rios de Lacerda

**Afiliação:** Aluna do 5ºano do Mestrado Integrado de Medicina Dentária da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto

**Endereço:** m4ry.lacerda@gmail.com

## **Orientador**

Nome Completo: **Paula Cristina dos Santos Vaz Fernandes**

Grau Académico: **Doutoramento**

Título Profissional: **Professora Associada**

Instituições a que está vinculado profissionalmente: **FMDUP**

## **Co-Orientador**

Nome Completo: **Filipe Poças de Almeida Coimbra**

Grau Académico: **Doutoramento**

Título Profissional: **Professor Associado**

Instituições a que está vinculado profissionalmente: **FMDUP**

**Porto 2013**

*Dedico este trabalho a todos os doentes oncológicos,  
pela força e coragem necessárias para vencer a  
doença.*

*Aos meus pais pela capacidade de me apoiarem e  
ensinarem que só quem luta é digno de sucesso.*

***“Even the smallest creature can change the course of the future”***

*Lord of The Rings: The Fellowship of the Ring*  
(Warner Brothers)

## RESUMO

**Introdução:** Os microRNA's estão relacionados com a regulação de vários processos celulares, nomeadamente na patologia do cancro oral. O seu papel na carcinogénese, invasão e metastização celular, diagnóstico precoce, prognóstico e terapêutica tem sido descrito, sendo no entanto fundamental uma investigação continuada que possibilite a definição de melhores opções terapêuticas e também uma melhoria na qualidade de vida destes doentes

**Objetivos:** Este trabalho teve como objetivo investigar o papel dos microRNA's na deteção precoce do cancro oral e as possibilidades terapêuticas dos mesmos.

**Materiais e Métodos:** Para a realização deste estudo foi feita uma pesquisa bibliográfica na base de dados PUBMED, limitada aos últimos 30 anos, ao idioma inglês e à relevância do respetivo título e resumo. Adicionalmente efetuou-se uma pesquisa em livros pedagógico-científicos da área abordada e em *sites* devidamente acreditados disponíveis na internet referentes a instituições oncológicas nacionais e internacionais.

**Desenvolvimento:** Dos estudos até ao momento desenvolvidos os microRNA's que se destacam com um maior interesse na deteção precoce e no prognóstico do cancro oral incluem o microRNA-200a, o microRNA-125a, o microRNA31, o microRNA-146a, o microRNA-17, o microRNA20-a, o microRNA-21, o microRNA-221 e o microRNA-181b. O método mais utilizado para reduzir a expressão dos microRNA's indesejáveis nas células tumorais consiste na tecnologia antisense, baseada na produção de microRNA's sintéticos (antagomiRs), o qual tem sido progressivamente melhorado através da introdução de oligonucleótidos modificados quimicamente, que proporcionam maior estabilidade e afinidade para o microRNA alvo e, consequentemente, maior eficiência do que os seus correspondentes.

**Conclusões:** Os microRNA's podem constituir excelentes biomarcadores moleculares no diagnóstico precoce do cancro oral. Novas investigações têm sido desenvolvidas no sentido de produzir um fármaco, à base de microRNA's, capaz de atuar nestes doentes, de tal modo a que as células normais do hospedeiro não sejam afetadas pelos agentes citotóxicos.

**PALAVRAS-CHAVE:** microRNA's; cancro oral; biomarcadores orais e cancro; diagnóstico precoce e terapêutica; epidemiologia do cancro oral; cancro oral em Portugal; fatores de risco e cancro oral.

## ABSTRACT

**Introduction:** MicroRNA's are related with the control of a variety of cell mechanisms, mainly in pathologies like oral cancer. Its role in the carcinogenesis, invasion and cellular metastasis, early diagnosis, prognosis and therapy has already been described, being, therefore, a continuous investigation that on the one hand allows the definition of the best available therapeutic options, and on the other can offer these patients a better quality of life.

**Objectives:** The aim of this research is to investigate the role of microRNA's in the early detection of oral cancer, as well as all possible therapies that these RNA molecules can offer to the world of Medicine.

**Materials and Methods:** This study was based on a bibliographic research in the PUBMED data base, limited to the English language, the last 30 years and the relevance of its title. A Scientific book research as well as highly credited World Wide Web pages, related to national and international oncological institutions were added to the content of this work.

**Discussion:** From all the studies analysed, the microRNA's with the most interest to the early detection and prognosis of oral cancer are the microRNA-200a, microRNA-125a, microRNA31, microRNA-146a, microRNA-17, microRNA20-a, microRNA-21, microRNA-221 and the microRNA-181b. The most used method to reduce the expression of all undesirable microRNA's in tumorous cells is based on the antisense technology that consists in the production of synthetic oligonucleotides microRNA's, that give a better stability and affinity to the targeted microRNA's, therefore being more efficient than its corresponding predecessors.

**Conclusions:** MicroRNA can be a valuable molecular biomarker in the early diagnosis of oral cancer. New investigations have been developed to find a drug, based on these microRNA's, that is capable of acting on oncological patients in a way that protects normal host cells from being targeted by cytotoxic agents.

**KEY-WORDS:** microRNA's; oral cancer; oral biomarkers and cancer; early diagnosis and therapy; epidemiology of oral cancer; oral cancer and Portugal; risk factors of oral cancer.

## AGRADECIMENTOS

À minha segunda casa, Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto, pela oportunidade de me proporcionar a elaboração deste trabalho, por ter sido o elemento fundamental na construção do meu sonho profissional e pelos anos de convivência com os mais maravilhosos colegas, professores e auxiliares.

À Professora Doutora Paula Vaz, minha estimada Orientadora, que desde o início se disponibilizou a ajudar-me na elaboração desta monografia, que caminhou comigo lado a lado, sobretudo durante o meu último ano de curso, que me acolheu com grande carinho e dedicação, transmitindo-me não apenas os conhecimentos necessários à minha formação no âmbito da Medicina Dentária, mas também aqueles imprescindíveis a ser uma profissional de saúde digna e dotada de valor moral.

Ao meu Co-orientador, Professor Doutor Filipe Coimbra, pela competência e exemplo profissionais que me transmitiu e por me ter disponibilizado fotografias do exaustivo trabalho clínico que diariamente desempenha e que tanto ajudaram a enriquecer o meu trabalho.

À minha Mãe, o pilar da minha vida, o meu exemplo de força, trabalho e devoção, que ilumina o meu caminho com o amor incondicional de mãe.

Ao meu Pai pelo incentivo constante, sem o qual seria difícil atingir os meus objetivos e conquistas.

À minha querida Tia Fátima (*in memoriam*), uma das pessoas mais maravilhosas que conheci e cujo fim de vida me inspirou a realizar este trabalho; pela força interior e coragem que a minha alma recebe sempre que a recorda.

À minha amiga do coração, Maria Celeste Sousa, por me ter ajudado a crescer, por me ter acompanhado em toda a minha vida de estudante, acreditando sempre em mim e no meu sucesso.

A todos as pessoas que me confiam a sua saúde e que acreditam no sucesso do meu trabalho e dedicação.

## **ABREVIATURAS**

miRNA – microRNA

mRNA – RNA mensageiro

ncRNA – RNA não codificante

RISC - RNA Induced Silencing Complex

dsRNA - double-stranded RNA

EGF – Fator de Crescimento Epidérmico

FGF – Fator de Crescimento Fibroblástico

TGF- $\alpha$  – Factor de Crescimento Tumoral Alfa

PDGF – Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas

Rictor - Rapamycin-insensitive companion of mTOR

MMP - Metaloproteinase da Matriz



## ÍNDICE

INTRODUÇÃO.....	X
MATERIAIS E MÉTODOS.....	XIII
DESENVOLVIMENTO.....	XIV
1. MicroRNA's: Contexto Histórico.....	XIV
2. Os microRNA's: Biogénese, Função e Papel no desenvolvimento e diferenciação tecidual .....	XV
3. Cancro oral.....	XVIII
3.1. A extensão do problema a nível mundial e europeu – Incidência; Mortalidade; Sobrevivência .....	XVIII
3.2. Cancro Oral em Portugal .....	XXIII
3.3. Doentes de risco .....	XXV
3.4. Formas de apresentação clínica.....	XXVI
3.5. Prognóstico e Qualidade de Vida dos Doentes Oncológicos .....	XXVIII
4. O papel dos microRNA's no cancro oral.....	XXIX
4.1. Os microRNA's e a Carcinogénese.....	XXIX
4.2. Os microRNA's e a Metastização .....	XXXI
5. MicroRNA's e o seu potencial na deteção precoce e prognóstico do cancro oral.....	XXXII
6. Potenciais usos dos microRNA's na Terapêutica do cancro oral .....	XXXV
7. Perspetivas Futuras - A importância de uma investigação continuada.....	XXXVII
CONCLUSÃO.....	XXXIX
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	XLI

## ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

Fig. 1: Marcos Históricos no estudo dos microRNA's.....	XV
Fig. 2: Biogénese dos microRNA's (miRNA's).....	XVI
Fig. 3: Taxa de incidência mundial de cancro oral e do lábio por 100.000 habitantes: ambos os sexos, todas as idades.. .....	XVIII
Fig. 4: Taxa de mortalidade mundial de cancro oral e do lábio por 100.000 habitantes: sem discriminação por género ou faixa etária.....	XX
Fig. 5: Taxa de incidência europeia de cancro oral e do lábio por 100.000 habitantes: ambos os sexos, todas as idades. ....	XXI
Fig. 6: Taxa de mortalidade europeia de cancro oral e do lábio por 100.000 habitantes: ambos os sexos, todas as idades. ....	XXII
Fig. 7: Sobrevivência dos pacientes 5 anos após o diagnóstico de cancro oral na Europa. ....	XXII
Fig. 8: Incidência e mortalidade por cancro do lábio e cavidade oral em Portugal por 100.000 habitantes, segundo a idade e género.....	XXIV
Fig. 9: Número de novos casos em 2030 de cancro do lábio e cavidade oral em Portugal (Todas as idades).. .....	XXIV
Fig. 10: Cancro oral. 1 e 2- Carcinoma da língua. 3- Carcinoma do lábio. 4- Carcinoma do pavimento da boca. 5- Carcinoma do palato. 6- Carcinoma do fundo do vestíbulo. 7- Carcinoma da mucosa jugal. ....	XXVII
Fig. 11: Mecanismos terapêuticos de inibição das moléculas de microrRNA's: mimetizadores do microRNA (verde), antagomiRs (cinzento), máscaras de microRNA (azul) e esponjas de microRNA. ....	XXXVI

## INTRODUÇÃO

O ser humano possui diferentes órgãos formados por tecidos especializados que, por sua vez, são compostos por células - a menor porção de um organismo vivo, capaz de executar autonomamente as funções básicas de reprodução e crescimento. Consoante a sua localização e função, as células apresentam características particulares, porém, todas as células do nosso organismo usufruem das mesmas unidades de hereditariedade, os genes. Os genes são constituídos por sequências específicas de Ácido Desoxirribonucleico (DNA), que transportam a informação genética característica de cada indivíduo <sup>(1, 2)</sup>. Atualmente sabe-se que existem cerca de 30.000 genes nos nossos cromossomas, no entanto, é também conhecido que nem todos estes genes estão ativos numa célula <sup>(3)</sup>. Na verdade, um gene apenas é expresso se o Ácido Ribonucleico mensageiro (mRNA) for produzido no núcleo celular, a partir do DNA e for transportado para o citoplasma, a fim de ser traduzido em proteínas (sendo que apenas uma pequena percentagem do genoma as codifica). Este fenómeno é, portanto, crucial para que ocorra uma regulação precisa da expressão génica e consequentemente um normal desenvolvimento e funcionamento do organismo <sup>(3)</sup>. Existem regiões inter-génicas que são também transcritas, originando moléculas imaturas de RNA (pré-RNA) constituídas por intrões (RNA não codificante) e exões (RNA codificante). Inicialmente pensava-se que este “lixo genético”, não codificador de proteínas, não detinha qualquer tipo de função <sup>(4)</sup>. Porém, nos últimos 10 anos, apesar do papel do RNA não codificante (ncRNA) permanecer um enigma, um grupo específico de ncRNA tem recebido uma crescente atenção científica – os microRNA's. Dos estudos realizados têm-se obtido resultados bastante promissores em termos médicos, sobretudo no que respeita à deteção precoce/ diagnóstico e terapêutica de inúmeras patologias, nomeadamente do cancro oral <sup>(5)</sup>.

O primeiro microRNA foi descrito em 1993, por *Lee et al.*, e identificado na *Caenorhabditis elegans* por regular o tempo de desenvolvimento das larvas, muito embora tenha sido designado de modo diferente - “short temporal RNA” (stRNA) - devido ao facto de ser expresso temporariamente <sup>(6)</sup>. Hoje em dia sabe-se que o nível destas pequenas moléculas e os alvos em que atuam encontra-se equilibrado em células saudáveis. Pelo contrário, nas células que originam sintomas de patologia pode ocorrer uma supressão ou sobre expressão dos microRNA's (dependendo do tipo de molécula e consequentemente do tipo de doença que causa) <sup>(7)</sup>.

Percebendo-se que os microRNA's possam desempenhar um papel importante na regulação de uma variedade de processos celulares, é fácil compreender que a desregulação dos

mesmos poderá estar associada a um leque bastante diversificado de patologias, como angina de peito, enfarte agudo do miocárdio, obesidade, diferentes tipos de neoplasias (cancro do pulmão, mama, colorretal, pâncreas, próstata, estômago, carcinoma papilar da tireoide, glioblastoma), entre outras, providenciando uma melhor compreensão do desenvolvimento destas doenças bem como a adoção de novas estratégias de diagnóstico precoce e terapêutica oncológica <sup>(6)</sup>.

Certas evidências indicam que os microRNA's possuem um papel fundamental na carcinogénese (*Dalmay & Edwards, 2006; Bartel, 2009*) <sup>(7, 8)</sup>. Concretamente há estudos que demonstraram uma sobre expressão de um microRNA específico, o miR-31, no carcinoma de células escamosas/carcinoma epidermóide, para além de outras neoplasias <sup>(9)</sup>. Foi, ainda, identificada a associação entre a elevada expressão de um outro microRNA, o microRNA-211, e as mais avançadas metástases para os nódulos linfáticos, a invasão vascular e o mau prognóstico do carcinoma epidermóide (*Chang et al., 2008*) <sup>(10)</sup>. Para o carcinoma epidermóide também foi demonstrada uma ação oncogénica de outros microRNA's, respetivamente o microRNA-21 e o microRNA-184 (*Chang et al., 2008; Wong et al., 2008*) <sup>(11, 12)</sup>.

Recentemente a saliva humana tem sido estudada para aplicações a nível de diagnóstico médico, terapêutico bem como, para outras implicações biológicas, nomeadamente para a deteção precoce de cancro oral, sobretudo o carcinoma de células escamosas <sup>(13)</sup>. Esta neoplasia representa cerca de 90% dos cancros orais, ocupando, segundo informações fornecidas pelo IPO de Lisboa, “o quinto lugar” na prevalência a nível nacional, tendo uma taxa média de sobrevivência de 50%, ou seja, de 5 anos após a sua deteção. Apesar de a sua incidência estar a aumentar cada vez mais em jovens do sexo feminino, a maioria dos casos de cancro oral em Portugal continua a ser descoberta na população mais idosa, sendo detetados anualmente 1500 novos casos, nomeadamente 1200 casos no sexo masculino e 300 no feminino <sup>(14)</sup>.

Neste contexto, este trabalho tem como principal objetivo procurar investigar o papel dos microRNA's na deteção precoce do cancro oral bem como as possibilidades terapêuticas que os mesmos podem oferecer às ciências médicas, de modo a que a melhoria da qualidade de vida e, quem sabe, a cura para esta doença mortal se tornem realidades cada vez mais próximas.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

Este estudo reveste-se de uma revisão da literatura disponível nos últimos 30 anos, na qual se realizou uma consulta de livros, “sites” legalizados de instituições oncológicas nacionais e internacionais (GLOBOCAN e RORENO) e artigos científicos selecionados através de busca no banco de dados “Pubmed”. A pesquisa dos artigos foi realizada utilizando a língua universal inglesa, tendo sido empregues variadas palavras-chave, especificamente relacionadas com o tema que o trabalho aborda. Os critérios de inclusão para os estudos encontrados foram, sobretudo, relacionados com a carcinogénese, diagnóstico, prognóstico e terapêutica do cancro oral através do emprego de microRNA's. Outras modalidades mais genéricas foram também aplicadas tais como, fatores de risco, incidência, prevalência e mortalidade desta classe de doentes. Foram excluídos estudos que relatavam o emprego de outras moléculas no cancro oral ou o emprego dos microRNA's noutro tipo de neoplasias malignas.

De seguida procurou-se estudar e compreender os principais parâmetros de interesse que deveriam ser incluídos neste trabalho, sobretudo os mecanismos através dos quais os microRNA's podem ser usados como biomarcadores de deteção precoce do cancro oral e o seu papel enquanto moléculas constituintes dos medicamentos usados na terapia do cancro da cavidade oral.

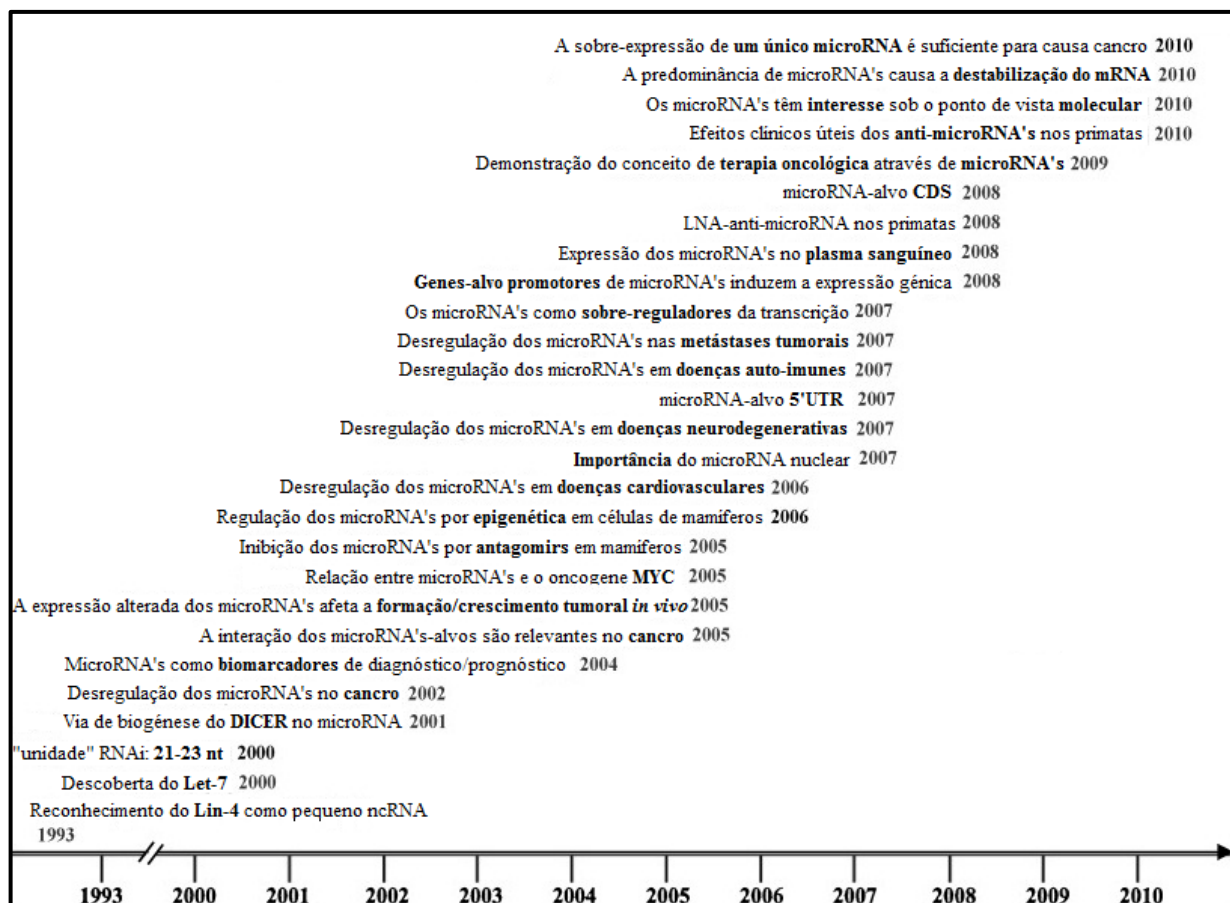
## DESENVOLVIMENTO

### 1. MicroRNA's: Contexto Histórico

Os micro-RNA's foram inicialmente descritos em 1993, por *Lee et al.* <sup>(5)</sup>, na *Caenorhabditis elegans*, animal vermiforme, como reguladores do tempo de desenvolvimento das larvas. Foi com a identificação dos genes de microRNA's *lin-4* e *let-7*, que atuam como repressores pós-transcricionais <sup>(15)</sup>, que a investigação de microRNA's começou. Pouco tempo depois, centenas de outros microRNA's foram encontrados em vermes, moscas, plantas e vertebrados <sup>(16,17)</sup>. Muitos destes são bem conservados entre espécies e têm sido encontrados nos reinos *Archaeobacteria* e *Eubactéria*, que é sugestivo de uma origem bastante remota <sup>(18)</sup>. Tal como referido por *Tarver et al* “A recente descoberta dos microRNA's em eucariontes unicelulares, incluindo microRNA's conhecidos anteriormente apenas em animais ou plantas, implica que estes possuem uma história evolutiva muito antiga.” <sup>(19)</sup>.

Atualmente mais do 1.048 microRNA's já foram descritos no genoma humano <sup>(20)</sup> e, na sua grande maioria foram identificados através de métodos moleculares tradicionais, tais como a clonagem e a sequenciação individual de pequenos RNA's <sup>(21)</sup>. Ainda assim, as metodologias baseadas na sequenciação de DNA capilar para identificação de novos microRNA's têm sido travadas, devido ao facto de as técnicas de clonagem serem laboriosas e as técnicas de sequenciação de DNA capilar serem bastante dispendiosas <sup>(22, 23)</sup>. Recentemente surgiram novas tecnologias de sequenciação que permitirão, num futuro próximo, metodologias mais económicas, bem como a obtenção de dados de expressão quantitativos <sup>(24)</sup>. O número de novos microRNA's descobertos tem, portanto, aumentado a cada dia sendo as respetivas sequências depositadas numa base de dados pública específica, a microRNA Base (<http://www.mirbase.org/cgi-bin/query.pl?terms=sequences>) <sup>(25)</sup>.

O rápido progresso científico constatado começou, então, a desvendar os papéis, a nível genético, dos microRNA's em desenvolvimento, tal como outros processos biológicos <sup>(18)</sup>.



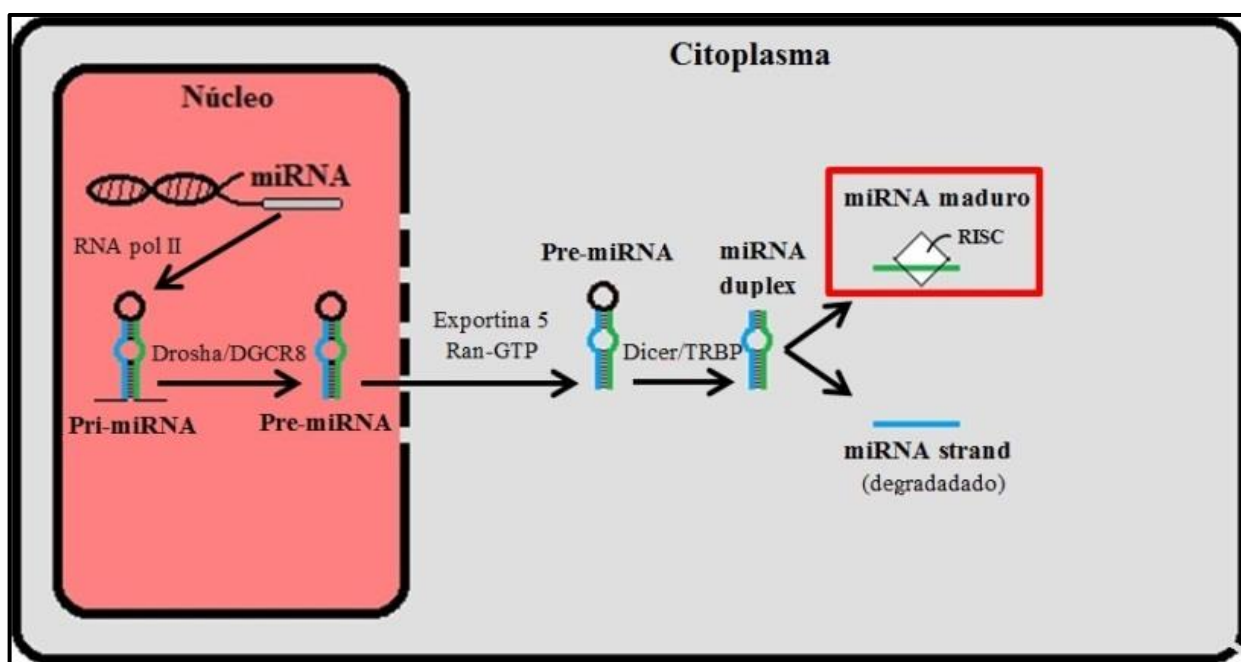
**Fig. 1:** Marcos Históricos no estudo dos microRNA's (Adaptado de Almeida M. et al, 2011 <sup>(26)</sup>. (Sem autorização do autor).

## 2. Os microRNA's: Biogénese, Função e Papel no desenvolvimento e diferenciação tecidular

Os microRNA's são pequenas moléculas com cerca de 20 nucleótidos de comprimento. Para contextualizar, a maioria do RNA mensageiro (mRNA) tem um comprimento entre 2.000 a 5.000 nucleótidos, pelo que, é fácil compreender porquê que os microRNA's só recentemente foram descobertos <sup>(3)</sup>.

No que respeita à biogénese destas moléculas, no núcleo celular os genes dos microRNA's são transcritos pela ação da RNA polimerase II, pelo mesmo processo de transcrição dos genes codificantes de proteínas <sup>(27)</sup>, resultando numa primeira e longa molécula transcrita, o pri-miRNA. De seguida, os pri-miRNA's são desagregados, ainda no interior do núcleo, pelo micro complexo Drosha/DGCR8 resultando desta clivagem um ou mais (no caso de "clusters"/aglomerados) precursores de miRNAs, os pré-miRNA. Os pré-miRNAs são moléculas com 70 a 90 nucleótidos que possuem uma forte estrutura secundária, com uma haste e uma

forma entrelaçada, habitualmente designada por “hairpin structure” ou “stem-loop structure”. Esta molécula é, então, transportada para o citoplasma da célula, por ação da exportina 5 e da Ran-GTP, onde será separada em microRNA’s de cadeia dupla ou “microRNA duplex”, por ação do Dicer/TRBP. O complexo referido reconhece a haste como sendo uma molécula de cadeia dupla de RNA (dsRNA - double-stranded RNA), libertando 21 pares de base do mesmo <sup>(3)</sup>. Seguidamente, uma das cadeias do microRNA duplex é incorporada num complexo proteico designado por RISC (RNA Induced Silencing Complex) <sup>(28)</sup> formando o microRNA maduro. A cadeia que sobrou e que não é incorporada no RISC designa-se por “microRNA strand” sendo degradada. O componente RISC do microRNA maduro tem como alvo o mRNA e, caso a complementaridade com o mRNA seja próxima da perfeição, o processo de tradução é suprimido no passo inicial ou de alongamento, podendo, ainda, ser induzido o processo de desadenilação, a destruição da cadeia 5’ do mRNA e consequente a destruição do mesmo, bem como a degradação dos alvos do mRNA sem capacidade de “turnover” (sem corpos-P/corpos de processamento) <sup>(6)</sup>.



**Fig. 2:** Biogénese dos microRNA’s (miRNA’s).

A expressão dos microRNA’s depende de vários fatores, tais como o tipo de tecido em questão, estados metabólicos e condições patológicas <sup>(18)</sup>. Tal como referido anteriormente, um dos potenciais dos microRNA’s consiste na capacidade de regular diversos mRNA’s associados que, por si só, regulam vários genes intervenientes no metabolismo celular <sup>(29, 30)</sup>. Estas pequenas moléculas são, portanto, consideradas como importantes reguladores envolvidos em diversos processos biológicos como a proliferação e diferenciação celular, desenvolvimento de tecidos e



células específicas, tendo ainda um papel ativo na homeostasia. Consequentemente, a sua desregulação implica uma falha em variados processos biológicos reguladores <sup>(18)</sup> e, consoante o padrão de stress induzido, diferentes consequências fenotípicas podem surgir <sup>(31)</sup>. Sabe-se que o stress induzido pela sobre-regulação de microRNA's pode resultar na sub-regulação de uma série de mRNA's alvo ou, pelo contrário, a deficiente regulação de microRNA's pode originar uma sobre-regulação de mRNA's. Assim sendo, um amplo leque de patologias encontram-se associadas a alterações de expressão de microRNA's <sup>(32)</sup>, tornando-se evidente que a sua expressão aberrante possui uma relação com a diversidade de estados patológicos <sup>(18)</sup>.

Relativamente à diferenciação celular e tecidual, vários estudos comprovam a ação dos microRNA's a este nível, constatando-se já uma ação em estadios iniciais da embriogénese. Durante a embriogénese muitos microRNA's exibem padrões de expressão tecidual específicos demonstrados por técnicas de hibridização *in situ* <sup>(33-35)</sup>. O miR-1 atua na diferenciação dos cardiomiócitos e é ainda altamente expresso no músculo-esquelético, diminuindo a expressão de miostatina e consequentemente aumentando a massa muscular <sup>(36)</sup>. O microRNA-122 possuiu um papel importante a nível do desenvolvimento e função hepática <sup>(30)</sup>. O microRNA-375 regula a secreção de insulina <sup>(37)</sup>. O microRNA-143 atua na regulação da diferenciação dos adipócitos <sup>(38)</sup>. O microRNA-124 tem um importante papel na diferenciação neuronal e desenvolvimento do sistema nervoso <sup>(39, 40)</sup>. O microRNA-181 possui como função a diferenciação dos linfócitos B <sup>(41)</sup>.

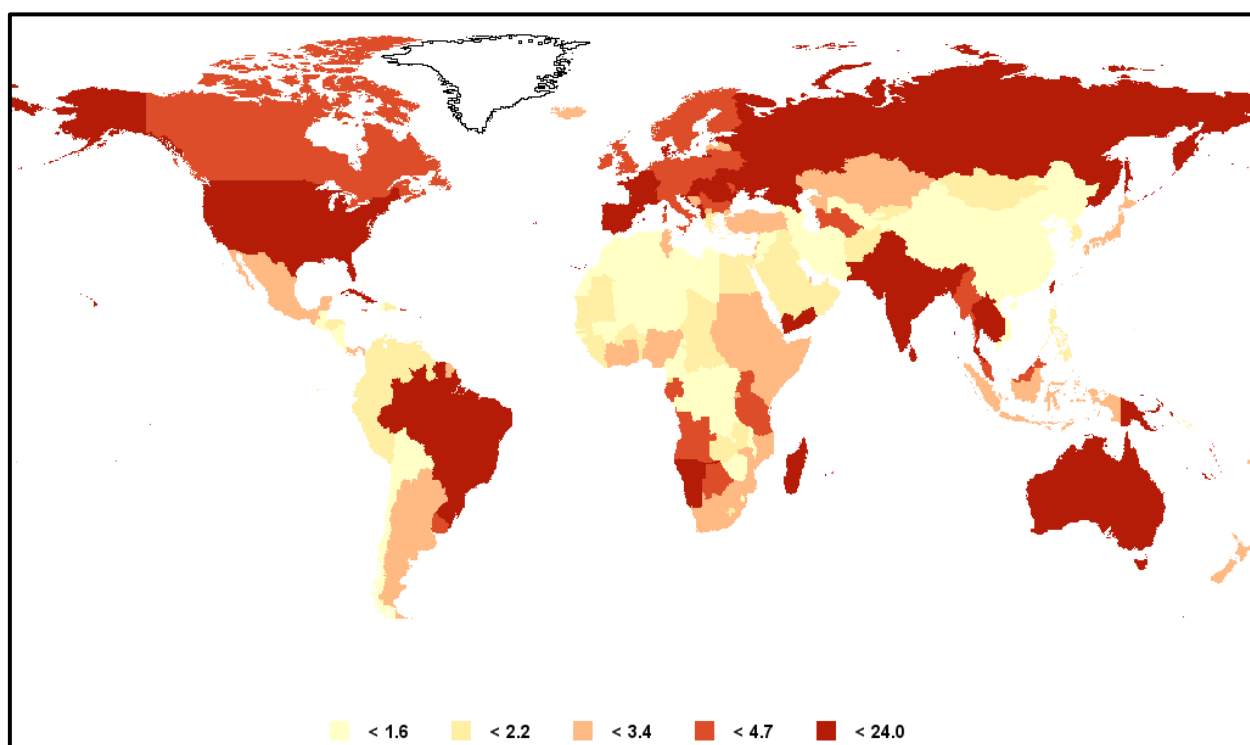
Entre os variados e complexos processos patológicos em que os microRNA's estão envolvidos, o cancro é de todos, a doença mais grave em termos de saúde pública. Este ocorre como resultado de um desequilíbrio nas interações entre oncogenes e supressores tumorais, dois tipos diferentes de genes que promovem, respetivamente, a proliferação celular e a formação de tumores ou repressão da divisão celular e a geração de tumor <sup>(18)</sup>. A descoberta de centenas de microRNA's representa, então, uma enorme complexidade na biologia molecular oncológica <sup>(42)</sup>, constituindo um novo obstáculo à compreensão do mecanismo exato de formação do cancro. Todavia, os microRNA's e os seus respetivos alvos representam também uma nova esperança em encontrar candidatos que mantenham o equilíbrio entre os supressores tumorais e oncogenes, que, deste modo, sejam capazes de cessar a doença <sup>(18)</sup>.

### 3. Cancro oral

#### 3.1. A extensão do problema a nível mundial e europeu – Incidência; Mortalidade; Sobrevivência

Na atualidade o cancro é uma das principais causas de morbilidade e mortalidade a nível mundial, com mais de 10 milhões de novos casos e mais de 6 milhões de mortes por ano. Mais de 20 milhões de pessoas por todo o mundo possuem um diagnóstico oncológico e mais de metade destes casos ocorrem nos países desenvolvidos devido à maior incidência de fatores de risco. Estima-se que em 2020 existirão 15 milhões de novos casos de cancro e 10 milhões de mortes por cancro <sup>(43)</sup>.

De acordo com dados revelados pela *WHO (World Health Organization)* no ano de 2008 as zonas geográficas, a nível mundial, com maior taxa de incidência de cancro oral e do lábio (sem discriminação de sexos) eram a Austrália, a América do Norte, a Europa Ocidental, a Rússia, a Índia e a zona ocidental da América do Sul. Pelo contrário, a zona norte e central de África, a Ásia, a América Central e o oeste da América do Sul estão entre os locais com menor incidência (Figura 3).



**Fig. 3:** Taxa de incidência mundial de cancro oral e do lábio por 100.000 habitantes: ambos os sexos, todas as idades. (Adaptação de GLOBOCAN 2008 (IARC) – 28.02.2013). (Sem autorização de autor).

A Índia desde sempre foi citada como o país com a maior taxa de incidência de cancro oral a nível mundial, sendo registados anualmente mais de 100.000 novos casos.<sup>(44)</sup> Gupta et al.,

(2013) demonstraram precisamente este facto, além de constatarem uma tendência crescente da incidência <sup>(45)</sup>. Considera-se que esta tendência estará diretamente relacionada com o elevado consumo de tabaco e agentes psicoativos de mascar (noz de areca, folha de bétel, entre outros) característico desta população. Similarmente a Melanésia possui uma elevada incidência (de 31,5 casos por 100.000 habitantes no sexo masculino e de 20,2 casos por 100.000 no sexo feminino (Parkin et al., 2005) <sup>(46)</sup>.

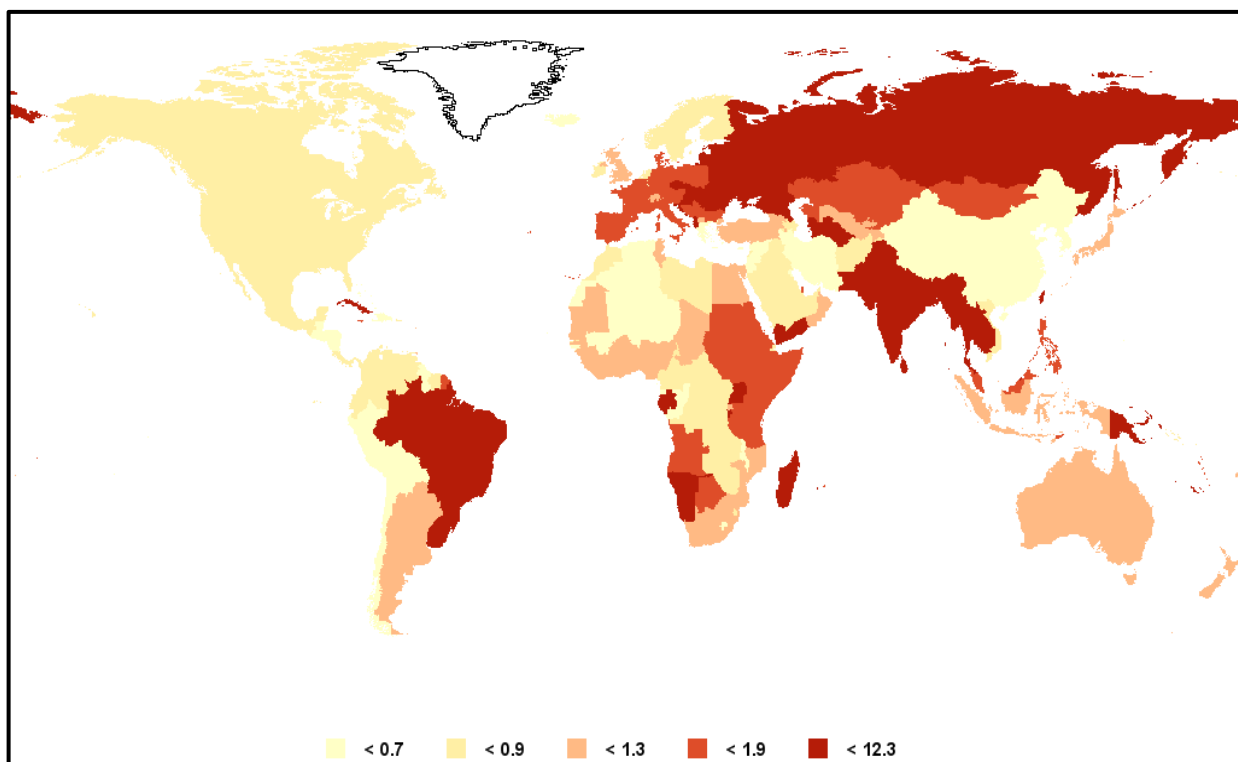
Nos países de alto risco, como a Índia, o Sri Lanka, o Paquistão e o Bangladesh, o cancro oral é mesmo considerado o tipo mais comum no sexo masculino e pensa-se que contribui para mais do que 25% de todos os novos casos de cancro <sup>(44)</sup>.

Num estudo epidemiológico realizado por Wunsch-Filho (2001) <sup>(47)</sup> verifica-se que a população masculina no Brasil possui o maior risco para o cancro oral logo a seguir à Índia e à França.

Por sua vez, para o cancro labial foi registada a maior taxa de incidência, num estudo desenvolvido por Sugerman PB & Savage NW (2002) <sup>(48)</sup>, na população branca no Canadá e na Austrália, representando mais de 50% de todos os casos de cancro oral.

Os dados relativos a África estão limitados a poucos registos hospitalares, pelo que se torna difícil extrapolar a verdadeira incidência nestas áreas geográficas. Contudo, as taxas descritas não demonstram evidência de que o cancro oral seja um problema de saúde grave no continente Africano <sup>(44)</sup>.

No entanto, no que respeita à taxa de mortalidade por cancro oral e cancro do lábio (a nível mundial) detetam-se taxas mais elevadas na Europa, em alguns países do Sul de África, na zona ocidental da América do Sul, na Rússia e na Índia (Figura 4).

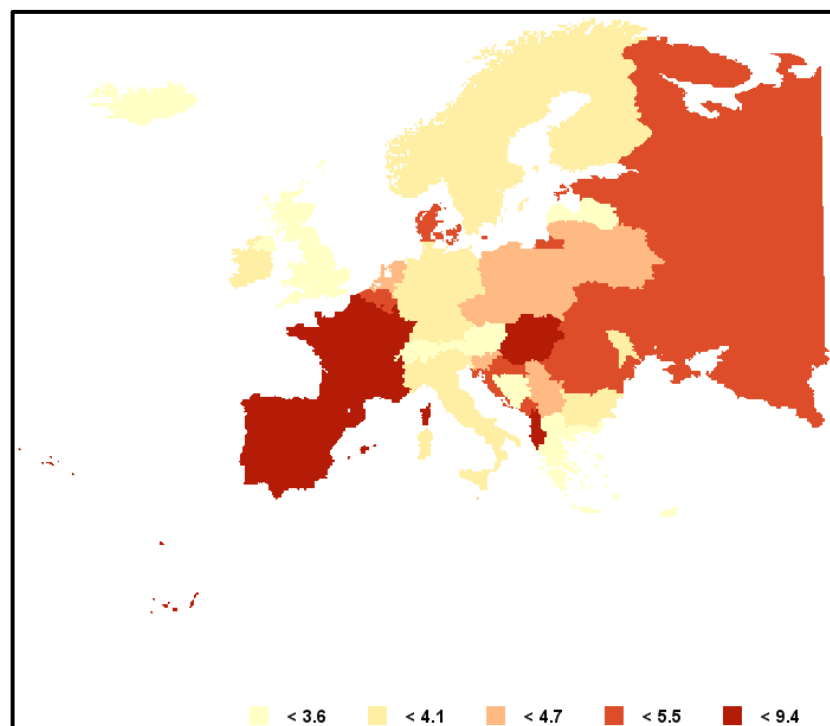


**Fig. 4:** Taxa de mortalidade mundial de cancro oral e do lábio por 100.000 habitantes: sem discriminação por género ou faixa etária. (*Adaptação de GLOBOCAN 2008 (IARC) – 28.02.2013*). (*Sem autorização de autor*).

Direcionando a atenção para a Europa, de acordo com dados revelados pela *WHO* no ano de 2008, a taxa de incidência de cancro oral e do lábio foi mais elevada em França, em Espanha, em Portugal e na Hungria (Figura 5).

De acordo com Warnakulasuriya S. (2009) <sup>(44)</sup> a maior incidência verificou-se no género masculino em França e na Hungria, correspondendo a mais baixa à Grécia e ao Chipre. Neste estudo estimou-se, ainda, que o risco de desenvolvimento de cancro oral e faríngeo a nível europeu foi de cerca de 1,85% para os homens e 0,37% para as mulheres. É igualmente importante referir que a taxa de incidência é bastante mais elevada nos países da Europa Ocidental quando comparada com o Norte e Sul da Europa. Dentro da União Europeia a França detém a taxa de incidência mais elevada (5,5%), sendo que aproximadamente 15.500 novos casos de cancro oral e do lábio são anualmente registados.

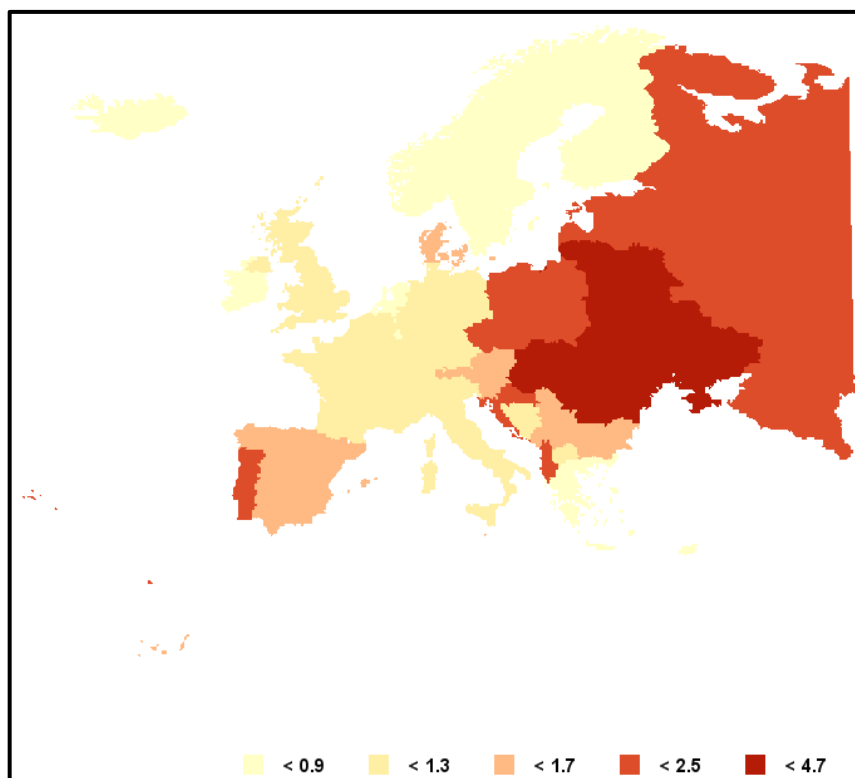
No Reino Unido a incidência do cancro oral não é tão comum. Respetivamente em 2010 confirmou-se o diagnóstico de cancro oral em 6.539 casos <sup>(46)</sup>.



**Fig. 5:** Taxa de incidência europeia de cancro oral e do lábio por 100.000 habitantes: ambos os sexos, todas as idades. (*Adaptação de GLOBOCAN 2008 (IARC) – 28.02.2013*). (*Sem autorização de autor*).

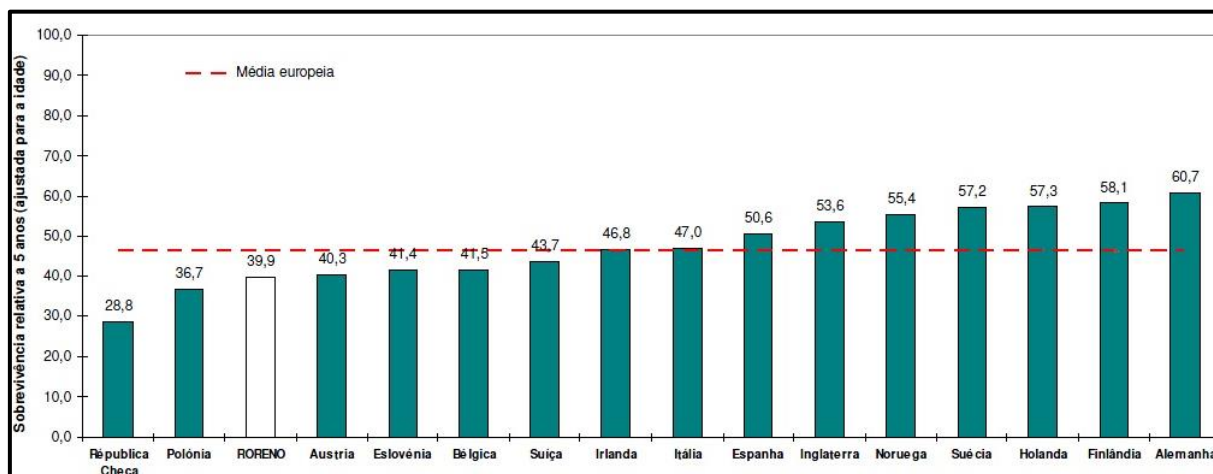
No que concerne à taxa de mortalidade a nível europeu, a França e os países da Europa de Leste, tais como a Hungria, a Croácia, a Eslovénia, a Roménia e a Ucrânia são os que a apresentam mais elevada. Portugal tem sido considerado um país com uma taxa de mortalidade intermédia (Figura 6) <sup>(46)</sup>.

O Reino Unido revelou a menor taxa de mortalidade sendo que, em 2010, foram registadas 1.985 mortes por cancro oral <sup>(49)</sup>.



**Fig. 6:** Taxa de mortalidade europeia de cancro oral e do lábio por 100.000 habitantes: ambos os sexos, todas as idades. (Adaptação de GLOBOCAN 2008 (IARC) – 28.02.2013). (Sem autorização de autor).

Segundo dados fornecidos pelo Registo Oncológico Regional do Norte de Portugal (Roreno, 2006) a Alemanha é dos países cuja sobrevivência relativa dos doentes 5 anos após o diagnóstico de cancro oral é mais elevada. Pelo contrário, a República Checa e a Polónia são os países cuja taxa de sobrevida aos 5 anos é mais baixa (Figura 7).



**Fig. 7:** Sobrevivência dos pacientes 5 anos após o diagnóstico de cancro oral na Europa. (Adaptado de Sant M. et al., 2009). (Sem autorização de autor) <sup>(50)</sup>.

### 3.2. Cancro Oral em Portugal

Segundo registos oncológicos de base populacional, em Portugal o cancro oral é uma patologia relativamente frequente, ainda, diagnosticada em fases tardias sendo, consequentemente, responsável por uma taxa de mortalidade elevada <sup>(51)</sup>.

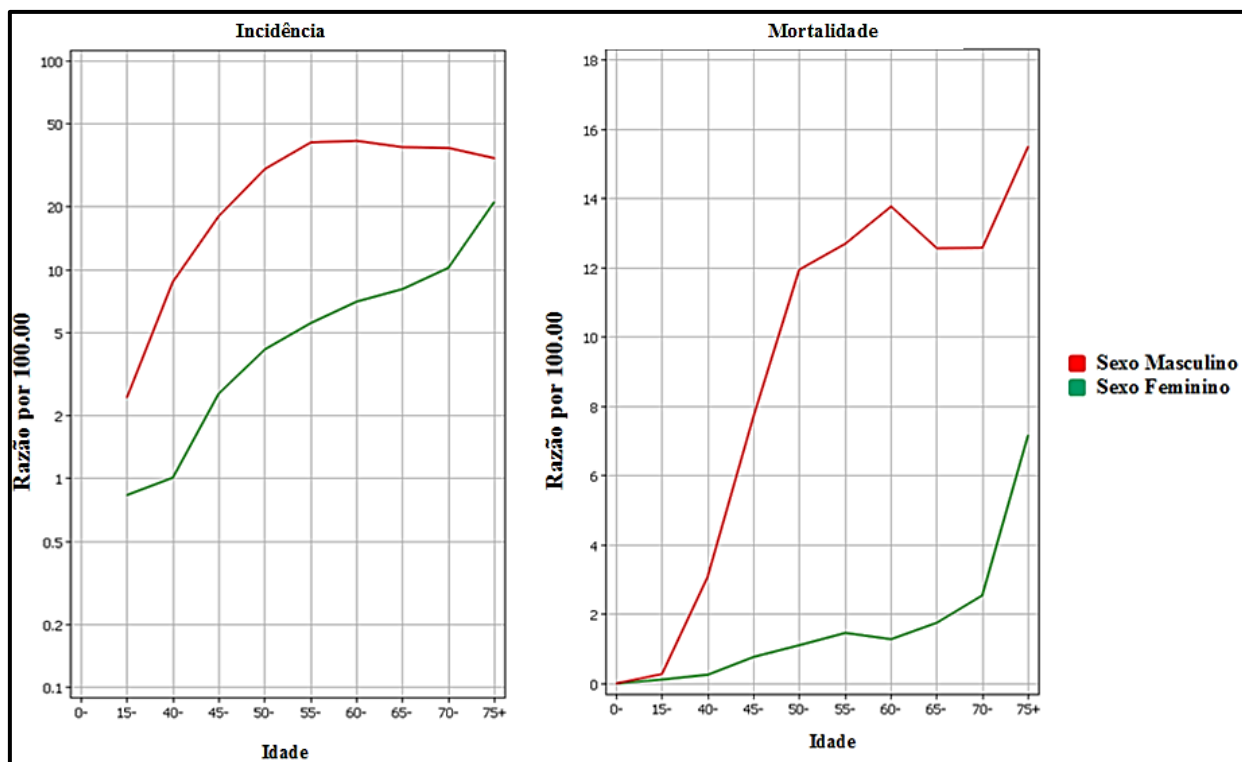
De acordo com *Pinheiro et al.*, (2002) <sup>(52)</sup>, em Portugal, incluindo as regiões Autónomas dos Açores e Madeira, registaram-se por ano cerca de 1.500 novos casos de cancro oral (aproximadamente 1.250 casos no género masculino e 250 casos no feminino). Investigações mais específicas desenvolvidas em território nacional demonstram a existência de variações regionais consideráveis, especificamente na comparação da incidência de cancro oral nos três registos oncológicos regionais, a qual revela uma taxa de incidência bruta (não padronizada) mais elevada na região sul do país. (*Roreno, 2006*).

Entre 2000 e 2006 foram diagnosticados 580 casos de tumores da cavidade oral na região Norte de Portugal (95% com informação de *follow-up*). Nos quais a sobrevivência relativa global a 5 anos foi de 39,9% (ajustada para a idade), enquanto a média europeia (EUROCORE-4) foi de 46,2% <sup>(51)</sup>.

Durante o período de 10 anos (de 1998 a 2007) foi registado um total de 9.623 casos de cancro do lábio, oral e da orofaringe, dos quais 7.565 (78,6%) registaram-se no sexo masculino e 2.058 (21,4%) no sexo feminino <sup>(53)</sup>.

A taxa de mortalidade para o cancro oral em Portugal aumentou aproximadamente 24%, de 1988 a 1998, sobretudo em homens de idade jovem e meia-idade, seguindo um padrão em que o aumento é cada vez mais elevado em camadas etárias sucessivamente mais jovens <sup>(52)</sup>.

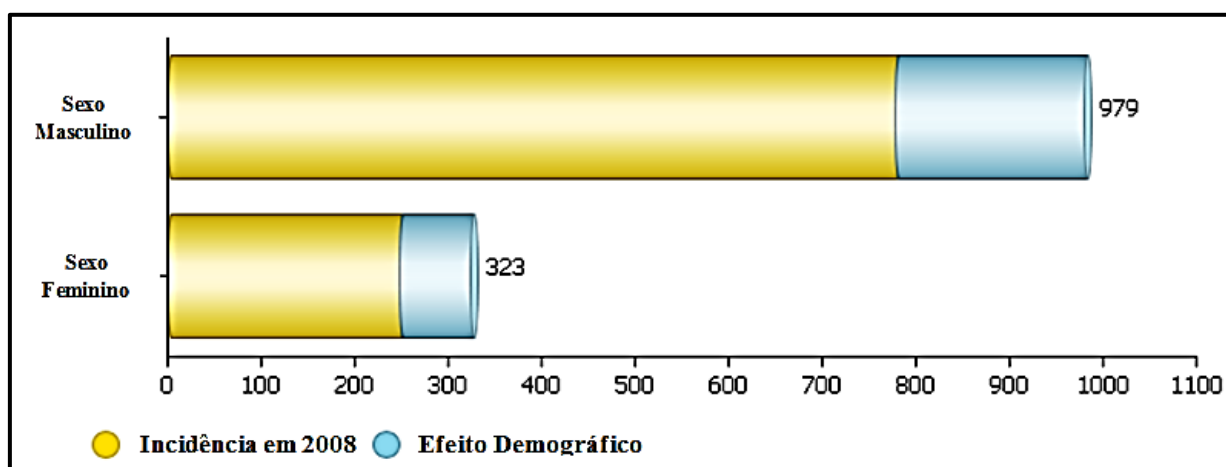
Em Portugal (dados de 2001), a razão entre óbitos por cancro oral e de faringe e de novos casos é de 51% no sexo masculino e de 38% no sexo feminino <sup>(51)</sup>.



**Fig. 8:** Incidência e mortalidade por cancro do lábio e cavidade oral em Portugal por 100.000 habitantes, segundo a idade e género. (Adaptação de GLOBOCAN 2008 (IARC) – 28.02.2013). (Sem autorização de autor).

De acordo com a *GLOBOCAN*, 2008, a incidência de cancro oral é mais elevada em indivíduos do sexo masculino com idades compreendidas entre os 55 e os 65 anos. Enquanto no sexo feminino a incidência aumenta a partir de idades superiores aos 70 anos. Quanto à taxa de mortalidade, esta apresenta-se mais elevada no sexo masculino após os 55 anos de idade e no sexo feminino após os 70 anos de idade.

Um estudo previsional para 2030 da *GLOBOCAN* prevê que a incidência de cancro do lábio e cavidade oral aumente (Figura 9).



**Fig. 9:** Número de novos casos em 2030 de cancro do lábio e cavidade oral em Portugal (Todas as idades). (Adaptação de GLOBOCAN 2008 (IARC) – 18.05.2013). (Sem autorização de autor).



### 3.3. Doentes de risco

Tal como já referido anteriormente, o cancro oral é mais frequente no género masculino, apesar do número de casos estar a aumentar no género feminino por todo o mundo (razão de 2:1 respetivamente).

Diversos estudos apontam no sentido da existência de um variado número de fatores de risco associados à maior incidência de cancro oral. Entre estes destacam-se os seguintes:

- hábitos tabágicos acentuados <sup>(54, 55)</sup>;
- alcoolismo <sup>(55)</sup>;
- maus hábitos de higiene oral <sup>(55)</sup>;
- negligência ou ausência de cuidados dentários <sup>(55)</sup>;
- baixo poder socioeconómico <sup>(55)</sup>;
- aumento da prática de sexo oral <sup>(54)</sup>;
- infeções víricas (por HPV) <sup>(56-58)</sup> e fúngicas (por *Candida albicans*) <sup>(54, 59)</sup>;
- exposição à radiação ultravioleta (sobretudo no cancro do lábio) <sup>(55)</sup>;
- deficiências nutricionais (vitaminas, ferro, entre outras) <sup>(60)</sup> e
- fatores traumáticos frequentes e permanentes (tais como como próteses mal adaptadas, mordiscar do lábio, fratura de peças dentárias) <sup>(61)</sup>.

A idade também contribui para uma variação na incidência do cancro oral, sendo que, nos países ocidentais da Europa, 98% dos casos ocorrem após os 40 anos de idade e os que desenvolvem doença com idades inferiores possuem habitualmente défices a nível do sistema imunitário (Infeções por HIV, Hepatite C, entre outros) <sup>(62)</sup>. Atualmente as faixas etárias mais jovens e sem os fatores de risco associados têm-se deparado com uma crescente taxa de incidência de cancro da cavidade oral. Este facto tem sido fundamentado com um determinado tipo de práticas sexuais, como o sexo oral, que podem originar infeções por HPV e, consequentemente, o desenvolvimento de cancro oral <sup>(63-65)</sup>.

Os agentes infecciosos são responsáveis por mais de 25% das mortes por cancro oral no mundo e por 6% nos países industrializados <sup>(43)</sup>.

O cancro oral está relacionado com fatores socioeconómicos e, como tal, possui as taxas mais elevadas a nível da população mais desfavorecida <sup>(44)</sup>.

### 3.4. Formas de apresentação clínica

O cancro da cavidade oral reveste-se de sinais e sintomas precoces e tardios consoante a fase em que se encontra ser respetivamente inicial ou tardia (Tabela I). Em fases iniciais o cancro oral geralmente é assintomático ou revela-se quanto muito como um pequeno desconforto a nível da mucosa oral. Porém, em fases tardias, existem variadas pistas que nos podem fazer suspeitar da existência de uma neoplasia maligna. Sabe-se que quanto mais cedo for o diagnóstico de cancro, e o cancro oral não é exceção, melhor é a resposta aos tratamentos e o prognóstico, aumentando a qualidade de vida e a sobrevida do paciente.

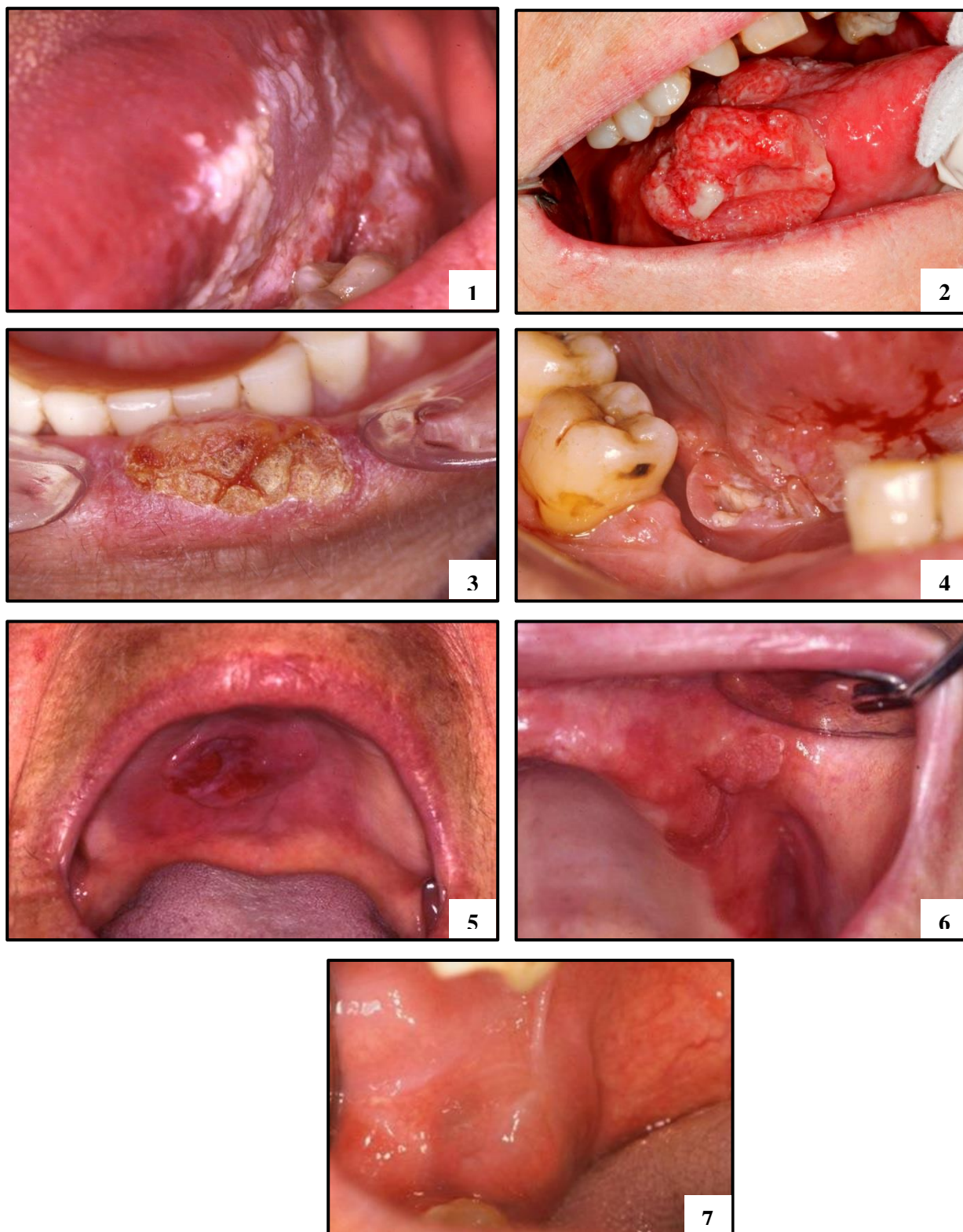
Deste modo, é fácil compreender a importância do exame clínico não só a nível do consultório médico-dentário, mas também nas consultas com o médico de família ou com o estomatologista. Este deve ser o mais rigoroso possível, deve englobar uma observação pormenorizada de todas as estruturas da cavidade oral e do pescoço e, em alguns casos, devem ser solicitados exames complementares de diagnóstico a fim de esclarecer dúvidas ou confirmar suspeitas.

**Tabela I:** Sinais e sintomas orais mais frequentes no cancro oral. (Adaptação de Santos LL e Teixeira LM, 2011). (Sem autorização dos autores).

SINAIS E SINTOMAS ORAIS MAIS FREQUENTES NO CANCRO ORAL
<b>Precoces:</b>
Manchas brancas ou avermelhadas na mucosa oral; Erosão ou úlcera que não cicatriza; Qualquer nódulo ou espessamento da mucosa; Desconforto ou dor persistente.
<b>Tardios:</b>
Ulceração da mucosa oral; Edema em qualquer região da cavidade oral que possa causar má adaptação das próteses; Dificuldade em mover a língua ou a mandíbula; Dificuldade em mastigar ou deglutir; Entorpecimento da língua ou de outra estrutura; Mobilidade dentária sem causa aparente; Nódulo submandibular ou no pescoço; O aparecimento de alterações na anatomia normal ou funcional da boca exige uma explicação. Por isso, quando há evidência de perturbações sensoriais ou motoras na realização do discurso verbal ou dificuldades de mastigação, justifica-se uma investigação mais aprofundada.

De todas as apresentações clínicas, a úlcera exofítica, de bordos elevados e endurecidos e fundo necrótico constitui a forma mais frequente de apresentação do cancro oral. Qualquer ulceração que não cicatrize deve, portanto, ser alvo de biópsia. As lesões pigmentadas superficiais ou nodulares e linfadenopatias com nódulos linfáticos endurecidos, fixos e pouco

dolorosos devem merecer especial atenção, porém são consideradas formas de apresentação mais raras de cancro oral <sup>(51)</sup>.



**Fig. 10:** Cancro oral. 1 e 2- Carcinoma da língua. 3- Carcinoma do lábio. 4- Carcinoma do pavimento da boca. 5- Carcinoma do palato. 6- Carcinoma do fundo do vestibulo. 7- Carcinoma da mucosa jugal. (Cortesia do Professor Doutor Filipe Coimbra.)

### 3.5. Prognóstico e Qualidade de Vida dos Doentes Oncológicos

Geralmente o prognóstico piora com o avanço da doença e com a dificuldade de acesso ao tumor, que vai aumentando de tamanho. Para o cancro da língua e da cavidade oral os jovens, sobretudo do sexo feminino, possuem uma taxa de sobrevivência mais elevada do que no sexo masculino. Porém, o estadió do tumor (TNM) aquando do seu diagnóstico afeta significativamente a sobrevivência do paciente após 5 anos. Neste contexto por exemplo um tumor da língua no estadió I de doença apresenta uma taxa de sobrevivência 5 anos após o diagnóstico de cerca de 80%, enquanto no estadió IV a mesma desce para 15% (Tabelas II e III) (44).

Apesar de alguns pacientes com cancro oral conseguirem ser tratados com sucesso, muitos deles têm que lidar com consequências devastadoras dos tratamentos. Este facto pode não só afetar a aparência física facial do doente, como também alguns mecanismos fisiológicos tais como a mastigação, deglutição e a fala, que por sua vez originam ciclicamente outro tipo de problemas, como sejam as depressões e as deficiências nutricionais. Assim sendo, a qualidade de vida destes doentes não deve ser esquecida nem posta de lado, pois é fundamental que os profissionais de saúde procurem proporcionar as melhores condições de saúde possíveis neste grupo de doentes tão vulneráveis.

**Tabela II:** Classificação por estadios e caracterização da neoplasia (segundo a 7ª edição). (Adaptação de Santos LL e Teixeira LM, 2011). (Sem autorização dos autores).

CLASSIFICAÇÃO	CARACTERIZAÇÃO DA NEOPLASIA
<b>Tx</b>	Tumor primário que não pode ser avaliado
<b>To</b>	Não há evidência de tumor primário
<b>T1</b>	Tumor até 2cm
<b>T2</b>	Tumor maior de dimensões compreendidas entre 2 e 4cm
<b>T3</b>	Tumor maior do que 4cm
<b>T4</b>	<b>A) Doença localmente avançada.</b> Lábio: o tumor invade as estruturas adjacentes, como a cortical óssea, língua e pele do pescoço. Cavidade Oral: o tumor invade estruturas adjacentes como a cortical óssea, musculatura profunda da língua, seio maxilar e pele. <b>B) Doença localmente avançada com extensão e invasão.</b> Invasão do espaço de mastigação, músculos pterigoideus, a base do crânio ou envolve a artéria carótida interna.
<b>Tis</b>	Carcinoma <i>in situ</i>

**Tabela III:** Estadio clínico (segundo a AJCC Cancer Staging Manual). (Adaptação de Santos LL e Teixeira LM, 2011). (Sem autorização dos autores).

ESTADIO	TAMANHO	GLÂNGLIOS LINFÁTICOS	METÁSTASES À DISTÂNCIA
<b>0</b>	Tis	Ausentes	Ausentes
<b>I</b>	T1	Ausentes	Ausentes
<b>II</b>	T2	Ausentes	Ausentes
<b>III</b>	T3	Ausentes	Ausentes
	T1	Único e menor que 3cm	Ausentes
	T2	Único e menor que 3cm	Ausentes
	T3	Único e menor que 3cm	Ausentes
<b>IV A</b>	T4	Ausentes	Ausentes
	T4	Único e menor que 3cm	Ausentes
	Qualquer T	Entre 3 e 6cm, único ou múltiplos, uni ou bilateral	Ausentes
<b>IV B</b>	Qualquer T	Maior que 6cm	Ausentes
	T4 B	Qualquer tipo de gânglio e de qualquer tamanho	
<b>IV C</b>	Qualquer T	Qualquer tipo de gânglio e de qualquer tamanho	Presença

#### 4. O papel dos microRNA's no cancro oral

##### 4.1. Os microRNA's e a Carcinogénese

A carcinogénese oral (processo de formação de lesões cancerígenas) é um processo complexo e composto por várias fases, em que os eventos genéticos (nas vias de tradução de sinal que regem a fisiologia celular normal) se encontram alterados quantitativa ou qualitativamente <sup>(66-68)</sup>. Em condições normais estas vias excitatórias e inibitórias são rigidamente controladas por mecanismos biológicos específicos do epitélio oral, sendo que as funções celulares básicas controladas por estes processos incluem a divisão celular, a diferenciação e a morte celular (apoptose). De um modo geral, o que ocorre é que um ligando extracelular, como por exemplo um fator de crescimento, liga-se a um recetor alvo na superfície da célula formando um complexo recetor-ligando que gera sinais, excitatórios ou inibitórios, transmitidos por determinados mediadores intracelulares e nucleares, os quais podem alterar a função celular, modificando, consequentemente, o efeito das proteínas <sup>(69)</sup>.

É fácil de perceber que o equilíbrio entre a proliferação celular e a apoptose é crucial para manter o normal crescimento celular e que qualquer distúrbio desta regulação (por acumulação ou defeito) pode originar neoplasias benignas ou malignas. No cancro, nomeadamente no da

cavidade oral, esta regulação é controlada pelos oncogenes (ativados por mutações pontuais, processos de amplificação ou por sobre-expressão génica), por genes de supressão tumoral (como a p53) e por fatores de crescimento (EGF – Fator de Crescimento Epidérmico; FGF – Fator de Crescimento Fibroblástico; TGF- $\alpha$  – Fator de Crescimento Tumoral Alfa e PDGF – Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas) <sup>(70)</sup>.

Estudos recentes indicam que os processos envolvidos na carcinogénese estão associados a alterações na expressão de diversos microRNA's, que tanto podem exercer funções como oncogenes ou supressores tumorais. Assim sendo, sabe-se hoje em dia que os microRNA's estão envolvidos no desenvolvimento e progressão do cancro.<sup>(71)</sup> Segundo Chu Y. *et al.* <sup>(72)</sup>, alguns polimorfismos dos genes dos microRNA's, aleados aos variados fatores de risco para o cancro, aumentam a suscetibilidade para a carcinogénese no cancro oral.

De acordo com o estudo referido o polimorfismo genético do miRNA499 está associado com a carcinogénese oral e a interação do polimorfismo do miRNA com a carcinogénese ambiental também está relacionado com o risco aumentado de cancro oral na população da República da China <sup>(72)</sup>.

Também se constatou que o consumo de tabaco aumenta consideravelmente o risco de desenvolvimento de cancro oral em indivíduos com polimorfismos nos miRNA146a, miRNA149, miRNA196 e miRNA499, quando comparados com indivíduos do tipo “selvagem” (fenótipo típico normal de cada espécie) não fumadores <sup>(72)</sup>.

Num estudo desenvolvido por Uesugi *et al.* <sup>(73)</sup>, em 2011, no tipo de cancro mais comum da cavidade oral (carcinoma escamoso espinocelular) o miRNA585, cuja função é de supressor tumoral, encontra-se frequentemente silenciado não pelo clássico processo mutacional, mas por hipermetilação do DNA. Este referido estudo identificou, ainda, que a proteína “Rictor” (*Rapamycin-insensitive companion of mTOR*) constitui um novo alvo do miRNA218, sugerindo que a ativação da via de sinalização do mTOR-Akt por ela induzida contribui para a carcinogénese oral.

Cervigne *et al.*, 2009 <sup>(74)</sup>, demonstrou que o aumento da expressão do microRNA-21, microRNA-181b e do microRNA-345 está associado à severidade de lesão e seu potencial maligno.

Em suma, apesar dos microRNA's serem bons candidatos na manutenção do equilíbrio entre os oncogenes e os genes de supressão tumoral nos tecidos sãos, também podem ser os responsáveis pela indução de cancro quando ocorrem processos anormais na sua expressão. Sendo que a sobre expressão dos microRNA's pode funcionar como um oncogene através da

supressão dos genes de supressão tumoral ou, por sua vez, a falta de expressão dos microRNA's pode atuar como um gene de supressão tumoral se o seu alvo é um oncogene <sup>(75)</sup>.

#### **4.2. Os microRNA's e a Metastização**

Tendo como base a evidência de estudos em modelos experimentais, o processo de carcinogênese pode ser dividido em três fases: iniciação, promoção e progressão <sup>(76)</sup>. Assim, clinicamente, os tumores podem ser divididos em três grupos, nomeadamente em lesões pré-malignas, em tumores primários e em metástases quando o tumor se propaga à distância <sup>(77)</sup>.

Durante a expansão das células tumorais originam-se novos clones com fenótipos malignos resultantes da acumulação de mutações génicas. Essas novas células clonadas (células que progrediram) podem ser mais invasivas e altamente metastáticas e, consequentemente, produzem metástases em nódulos linfáticos <sup>(78)</sup>.

Uma característica major celular no cancro da cavidade oral consiste na sua capacidade em invadir os tecidos vizinhos e em formar focos de metástases em locais à distância no organismo. Numa fase inicial de invasão, as células tumorais destacam-se do tumor primário e migram para os tecidos adjacentes. Na maior parte dos casos em que ocorre invasão celular, as células cancerígenas atingem os vasos linfáticos e sanguíneos (angiogénese) através dos quais conseguem espalhar-se por todo o organismo, extravasar e iniciar metástases longe do local primário da lesão tumoral. Uma vez que as células se espalham, este processo torna-se muito difícil de controlar, piorando drasticamente o prognóstico.

Atualmente é bem aceite que a remoção da matriz extracelular na invasão tumoral ocorre devido à ação de uma variedade de enzimas de degradação produzidas quer pelas próprias células tumorais quer pelas células do hospedeiro <sup>(79, 80)</sup>. A expressão da metaloproteinase da matriz (MMP) tem um papel fundamental na capacidade das células, do carcinoma espinocelular, invadirem a matriz extracelular. Assim sendo, pode-se concluir que este tipo de enzimas desempenha uma ação decisiva no mecanismo de invasão por parte das células tumorais <sup>(81)</sup>.

Hoje em dia é conhecido que a desregulação dos microRNA's (quer seja por sobre expressão ou perda de expressão) está envolvida nos processos de iniciação e progressão tumoral devido aos seus efeitos causadores de proliferação descontrolada, sobrevivência favorável, inibição da diferenciação e/ou promoção de comportamento invasivo celular <sup>(82, 83)</sup>. Análises

funcionais indicaram que o miRNA-222 inibe a invasão celular no carcinoma escamoso celular da língua <sup>(84)</sup>.

Um estudo demonstrou que o miRNA-145 é regulado negativamente devido à ação do tabaco, acompanhando-se este facto pela sobre expressão da MMP-2 e pela supressão da capacidade dos fibroblastos em promover a quimiotaxia de células cancerosas por via oral <sup>(85)</sup>.

Polimorfismos genéticos do microRNA499 foram associados a metástases do carcinoma mucoepidermóide oral <sup>(72)</sup>.

## **5. MicroRNA's e o seu potencial na deteção precoce e prognóstico do cancro oral**

Reconhecendo o impacto que o cancro oral possui na saúde do ser humano, facilmente se compreende que o diagnóstico precoce das neoplasias malignas em estadios iniciais é fundamental para assegurar um melhor tratamento para o doente (menos dispendioso e mais conservador), uma melhor qualidade de vida e um aumento da sobrevivência do mesmo.

Neste contexto, a evolução tecnológica tem-se demonstrado extremamente relevante por ter disponibilizado novas ferramentas de diagnóstico e nova informação relacionada com a patogénese de determinadas doenças da cavidade oral, como foi o caso concreto das lesões neoplásicas <sup>(86)</sup>.

A análise do perfil de vários tipos de cancro revelou alterações nos níveis de microRNA's que, curiosamente, eram mais frequentemente por sob expressão do que por sobre expressão, possivelmente devido a defeitos na diferenciação das células cancerosas <sup>(6)</sup>. Também tem sido demonstrado que existem biomarcadores específicos para cada tipo de cancro, marcadores estes que têm sido considerados bastante úteis na sua deteção, classificação e prognóstico (Tabela IV) <sup>(6)</sup>. Lu *et al.*, (2005) <sup>(71)</sup>, referem que os microRNA's e os mRNA's constituem bons marcadores a serem usados na classificação de neoplasias malignas pouco diferenciadas, devido à estreita relação com a linhagem e diferenciação celular.



**Tabela IV:** Os microRNA's como biomarcadores no carcinoma escamoso celular da cavidade oral. Relato em literatura recente (Adaptado de Shiiba *et al.*, 2010) <sup>(87)</sup>.

<b>Autores (Ano)</b>	<b>Propriedades dos microRNA's como biomarcadores</b>	<b>Referência</b>
Avissar et al. (2009)	A razão da expressão do “microRNA-221:microRNA-375” exibiu a mais forte capacidade para diferenciar o cancro oral e do pescoço de células escamosas de epitélios sem a doença.	(88)
Cervigne et al. (2009)	A sobre-expressão do microRNA-21, do microRNA-181b e do microRNA-345 está associada ao aumento da severidade durante a progressão da doença.	(74)
Chang et al. (2008)	A expressão do microRNA-211 foi superior nos tumores com metástases nodulares ou vasculares do que nos tumores menos agressivos. Os pacientes com elevada expressão de microRNA-211 tiveram taxas de sobrevivência piores do que os outros grupos. Os dados sugerem que a expressão do microRNA-211 pode ser um valioso indicador de prognóstico do cancro oral.	(10)
Childs et al. (2009)	Os baixos níveis de expressão do microRNA-205 foram associados com a recorrência regional do tumor. A combinação de baixos níveis de microRNA-205 e baixo nível de let-7d foi significativamente associada com taxas de sobrevida.	(89)
Park et al. (2009)	Os níveis de expressão do microRNA-200a e do microRNA-125a foram significativamente menores na saliva de pacientes com carcinoma oral de células escamosas.	(90)
Wong et al. (2008)	Os níveis plasmáticos de microRNA-184 foram significativamente maiores em pacientes com cancro da língua e reduzidos após a remoção cirúrgica dos tumores primários.	(12)
Liu et al. (2010)	O microRNA-31 encontra-se significativamente elevado em pacientes com cancro oral de células escamosas e os seus níveis foram notavelmente reduzidos após a ressecção do tumor.	(9)

A identificação de novos microRNA's salivares, que em estudos anteriores passaram despercebidos, tem-se tornado útil na compreensão de determinados processos moleculares <sup>(91)</sup>.

Algumas alterações na expressão dos microRNA's da saliva de indivíduos saudáveis relativamente a indivíduos com carcinoma escamoso celular oral têm sido relatadas <sup>(92)</sup>. Além disso, tipos específicos de microRNA's salivares têm sido examinados de fluídos biológicos com relevância forense <sup>(93)</sup>. Recentemente certos estudos demonstraram também que os microRNA's e os mRNA's podem ser detetados dentro de estruturas designadas por exossomas (complexos proteicos envolvidos na degradação do RNA) encontrados na saliva <sup>(94-96)</sup>.

Relativamente aos microRNA's com interesse do ponto de vista de deteção precoce e prognóstico do cancro oral salientam-se o microRNA-200a, o microRNA-125a <sup>(92)</sup>, o

microRNA31<sup>(13)</sup>, o microRNA-146a<sup>(72)</sup>, o microRNA-17, o microRNA20-a<sup>(97)</sup>, o microRNA-21, o microRNA-221 e o microRNA-181b<sup>(98, 99)</sup>. No entanto, é importante referir que existem outros tipos de microRNA's salivares que têm sido alvo de estudo e constante investigação devido ao seu interesse sob o ponto de vista de diagnóstico precoce e terapêutica do cancro oral, concretamente pela atividade proliferativa, potencial invasivo e metastáticos<sup>(100)</sup>.

O microRNA-200a e o microRNA-125a encontram-se em níveis significativamente mais baixos na saliva em doentes com carcinoma oral de células escamosas<sup>(92)</sup>.

Os níveis de microRNA-31 salivar estão bastante aumentados em pacientes com carcinoma oral em todos os estadios clínicos, incluindo tumores muito pequenos e em estadios iniciais. Porém, em lesões pré-malignas como a leucoplasia verrugosa, tal não se verifica<sup>(13)</sup>.

O microRNA146a pode contribuir para a progressão tumoral, metástases, diagnóstico/prognóstico e terapêutica tanto do cancro gástrico, como do cancro oral<sup>(72)</sup>.

O microRNA-17 e o microRNA-20a podem ser usados como biomarcadores no prognóstico do carcinoma escamoso celular da cavidade oral<sup>(97)</sup>.

Garzon *et al.*, (2009)<sup>(98)</sup>, neste contexto expõem uma lista de microRNA's associados ao cancro oral, destacando o microRNA-21, o microRNA-221 e o microRNA-181b como fortes marcadores de diagnóstico precoce do carcinoma mucoepidermóide oral.

Relativamente à predição de doença Avissar *et al.*, (2009)<sup>(88)</sup>, demonstraram que o rácio entre a sobre expressão do microRNA-221 e a sub-expressão do microRNA-375 revela uma elevada sensibilidade e especificidade, concluindo que os mesmos devem ser avaliados como potenciais biomarcadores de diagnóstico para prevenção e criação de estratégias terapêuticas do carcinoma escamoso celular da cabeça e pescoço.

O microRNA-21 indica um mau prognóstico no carcinoma escamoso celular da língua devido ao facto de ser um inibidor da apoptose<sup>(101)</sup>.

Park *et al.*, (2009)<sup>(92)</sup>, ao quantificarem, a nível salivar, um total de 314 microRNA's, detetaram níveis significativamente mais baixos do microRNA-125a e do microRNA-200a em pacientes com tumores da cavidade oral. O resultado obtido é sugestivo de um potencial papel destes microRNA's como marcadores de diagnóstico para o cancro oral.

Estudos desenvolvidos por Wong *et al.*, (2008)<sup>(12)</sup> e Liu *et al.*, (2010)<sup>(9)</sup>, sobre o microRNA-184 e o microRNA-31, sugerem que para além da deteção a nível salivar, estes detêm uma ação oncogénica no carcinoma escamoso celular da cavidade oral, podendo a sua deteção a nível sanguíneo constituir uma abordagem bastante útil sob o ponto de vista clínico.

Assim, verificamos que a literatura recente tem sugerido que a detecção dos microRNA's na saliva pode ser usada como meio de diagnóstico precoce, rápido e não invasivo do cancro oral <sup>(92)</sup>.

## **6. Potenciais usos dos microRNA's na Terapêutica do cancro oral**

A rápida acumulação de evidência científica de estudos recentes sugere que os microRNA's são alvos bons e viáveis para a terapia de numerosas doenças, nomeadamente do cancro <sup>(6)</sup>.

Sendo conhecido que mais de 30% dos genes humanos são regulados por microRNA's <sup>(102)</sup>, o desenvolvimento de novas tecnologias para controlo da expressão destes genes por modulação da atividade dos microRNA's pode representar um passo importante na terapia oncológica. Atualmente existem dois tipos de estratégias desenvolvidas no sentido de tentar modular a atividade dos microRNA's na terapêutica do cancro, nomeadamente na sobre expressão dos genes de supressão tumoral por inibição dos microRNA's e na supressão dos oncogenes por sobre expressão dos respetivos microRNA's <sup>(75)</sup>.

A primeira estratégia usada na modulação dos microRNA's baseia-se na introdução de moléculas que mimetizam a expressão de microRNA's protetores que existem em níveis diminuídos no cancro. Enquanto a segunda estratégia consiste na introdução de antagomiRs que são microRNA's sintéticos (com a mesma sequência e estrutura dos microRNA's naturais de interesse) cuja função é inibir os microRNA's oncogénicos que estão sobre expressos nas células tumorais <sup>(103)</sup>.

Uma característica importante da modulação da expressão dos microRNA's é que um microRNA é capaz de silenciar vários genes, ao contrário da tecnologia de interferência do RNA que é capaz de silenciar apenas um gene ou poucos genes pertencentes à mesma família. Este facto torna a terapia de modulação dos microRNA's sobre expressos numa ferramenta poderosa no tratamento oncológico, bem como, na compreensão dos fenómenos de carcinogénese <sup>(104)</sup>.

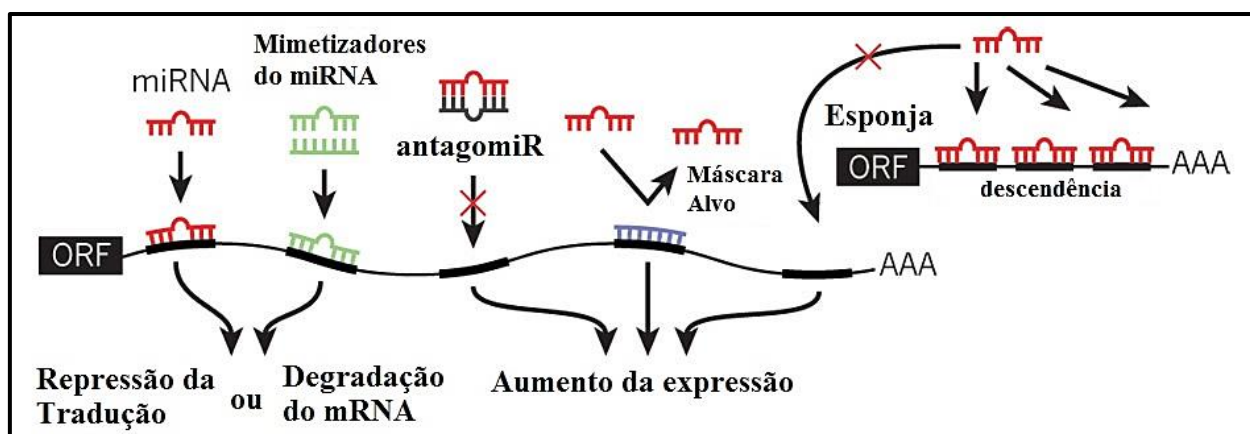
A tecnologia *antisense* baseada nos antagomiRs (Figura 10) é o método mais utilizado para reduzir a expressão dos microRNA's indesejáveis nas células tumorais e tem sido progressivamente melhorado através da introdução de oligonucleótidos modificados quimicamente, que proporcionam maior estabilidade e afinidade para o microRNA alvo e, consequentemente, maior eficiência do que os seus correspondentes <sup>(105)</sup>. As principais modificações introduzidas incluem os grupos 2'-O-metil e o 2'-O-metoxietil <sup>(75)</sup>.

Uma outra estratégia possível prevê a utilização de complexos específicos, designados por microRNA's "sponges" <sup>(106)</sup> que contêm inúmeros locais de ligação para um ou vários microRNA's, tratando-se de um processo de competição dos recetores-alvo de interesse <sup>(107)</sup>.

Segundo Kluiver *et al.*, (2012) <sup>(108)</sup>, os microRNA's "sponges" (Figura 10), tendo como principal função o sequestro de microRNA's dos seus alvos endógenos, constituem um método valioso para a perda de função dos microRNA's oncogénicos, tal como comprovado em estudos realizados *in vitro* e *in vivo*. Além disso, os autores demonstraram que a inibição combinada dos microRNA's através deste método (pois cada microRNA "sponge" tem vários locais de ligação) apresenta resultados mais eficazes quando comparada com a inibição individual dos microRNA's.

Ainda outra metodologia que se pode adotar inclui oligonucleótidos complementares ao local de ligação dos microRNA's, "microRNA masks" ou "Máscaras de microRNA" (Figura 10), numa terminação específica, a 3'UTR, correspondente a uma secção do mRNA que vai desde o codão de finalização até ao final da cauda poli-A do gene alvo, prevenindo a ligação do microRNA ao seu recetor <sup>(109)</sup>.

Por último, os mimetizadores do microRNA (Figura 10) consistem numa dupla fita de oligonucleótidos de microRNA e uma fita única de ligação. Este processo permite que o microRNA "imitador" tenha a mesma sequência de um microRNA endógeno e que seja projetado, de modo a atacar os mesmos mRNA's como os microRNA's originais <sup>(110)</sup>.



**Fig. 11:** Mecanismos terapêuticos de inibição das moléculas de microRNA's: mimetizadores do microRNA (verde), antagomiRs (cinza), máscaras de microRNA (azul) e esponjas de microRNA. (Adaptado de Eric *et al.*, (2011). (Sem autorização do autor) <sup>(110)</sup>. ORF – Início da grelha de leitura. AAA – Codão de terminação.

Um estudo recente de Rather M *et al.*, (2013) <sup>(111)</sup> comprovou que a transferência de um antagonista do microRNA-155 (antagomir-155) em células tumorais do cancro oral, cuja expressão de microRNA-155 está aumentada, resulta num aumento dos níveis de CDC73, diminuindo a viabilidade das células tumorais e aumentando o processo de apoptose. Este facto

exerce um papel importante na intervenção terapêutica do carcinoma de células escamosas da cavidade oral.

Apesar de várias técnicas de introdução de microRNA's a nível celular terem sido descritas, a sua utilização *in vivo* continua a ser um grande obstáculo, por serem moléculas muito pequenas e os ácidos nucleicos terem carga negativa, não penetrando facilmente na membrana celular <sup>(104)</sup>. Para ultrapassar estas dificuldades várias estratégias têm sido propostas, tais como a modificação química das moléculas para aumentar a sua eficácia, assim como a encapsulação de oligonucleótidos nos lipossomas e a introdução de vetores virais <sup>(103)</sup>.

O primeiro ensaio clínico utilizando a terapia baseada nos microRNA's teve início em 2008, com propósito de intervenção na hepatite C utilizando oligonucleótidos complementares ao microRNA-122, que é um oncogene que facilita a replicação viral <sup>(112)</sup>. Apesar de ser o único estudo baseado na manipulação da expressão de microRNA's, outros têm sido iniciados com o objetivo de tratamento de inúmeras doenças, entre as quais, o cancro oral <sup>(104)</sup>.

## **7. Perspetivas Futuras - A importância de uma investigação continuada**

Nas últimas duas décadas o desenvolvimento de técnicas de biologia molecular promoveu uma nova compreensão acerca do mundo oncológico. Em consequência surgiu uma enorme variedade de novos alvos para o desenvolvimento de terapias eficazes, algumas das quais já inseridas na terapia génica, a qual se perspetiva como possível pioneira nas opções terapêuticas das próximas décadas <sup>(77)</sup>.

A descoberta dos microRNA's representa uma nova opção na compreensão da regulação da expressão génica no genoma humano e, apesar de ser uma área de investigação relativamente recente, as novas tecnologias de sequenciação molecular permitiram a identificação da maioria dos microRNA's humanos. No entanto, existem ainda muitos aspetos não compreendidos, tais como, a quantidade de microRNA's que está realmente envolvida na carcinogénese, o número total de genes-alvo para cada um desses microRNA's, os mecanismos patogénicos envolvidos no cancro, entre outros. Neste contexto, os investigadores têm desenvolvido técnicas que possibilitem uma descrição pormenorizada das diferentes utilizações dos microRNA's, respetivamente o seu potencial no diagnóstico precoce e prognóstico do cancro, novos métodos que permitam a descoberta de novos oncogenes e genes de supressão tumoral regulados por microRNA's e as suas aplicações terapêuticas <sup>(75)</sup>.

Apesar de todos estes avanços promissores, existem, ainda, duas preocupações que necessitam ser resolvidas antes de utilizar a tecnologia microRNA na prática clínica, por um lado na identificação dos genes-alvo de cada microRNA e, por outro, novos desenvolvimentos na criação e entrega de medicamentos à base de microRNA's. Além disto, o facto de um microRNA poder regular centenas de diferentes mRNA's constitui uma enorme desvantagem para as terapias médicas futuras. Este problema da existência de múltiplos alvos associados à terapia com microRNA's poderia, contudo, ser contornado caso se aborda-se pela resolução do segundo problema, nomeadamente o da criação de novos métodos e composições que permitam a entrega específica do fármaco à base de microRNA à população de células cancerígenas e não às células normais do hospedeiro <sup>(75)</sup>.

A contínua aplicação de tecnologias de sequenciação génica e de microRNA's terá como desfecho mais provável um aumento da nossa compreensão e conhecimento acerca do cancro da cabeça e pescoço, bem como, de outras doenças da cavidade oral. Como tal, possibilitará a prestação de cuidados de saúde mais eficazes e individualizados a cada doente. O grande desafio consistirá, sobretudo, no reconhecimento dos alvos dos microRNA's, sob o ponto de vista terapêutico, sendo, por isso, necessários o desenvolvimento de vários estudos de longa escala para que essa informação seja revelada, corretamente compreendida e utilizada eficazmente na tão esperada cura oncológica <sup>(86)</sup>.

## CONCLUSÃO

O correto diagnóstico e tratamento do cancro oral exige a interação de uma equipa multidisciplinar, tornando-se fundamental que os médicos, médicos dentistas e outros profissionais de saúde, invistam na formação vocacionada para o cancro da cabeça e pescoço, de modo a permitir uma melhoria nos cuidados de saúde prestados e, consequentemente, um aumento da qualidade e sobrevida deste grupo de doentes oncológicos.

Este trabalho teve como principal objetivo abordar o papel dos microRNA's, a nível da biologia molecular tumoral, no diagnóstico precoce e no tratamento de neoplasias malignas da cavidade oral. A revisão da bibliografia disponível até ao momento pretendia despertar a atenção para investigações complementares, neste caso, a nível molecular, para que num futuro próximo seja possível implementar tratamentos mais conservadores para os pacientes. Assim, conjugando a importância da crescente incidência de cancro oral, a nível mundial, e das possibilidades de diagnóstico precoce e terapêutica no aumento da sobrevida destes doentes, não deve deixar de ser sublinhada a extrema necessidade de uma investigação continuada, de modo a enriquecer as investigações oncológicas, que prometem proporcionar novas abordagens preventivas e terapêuticas do cancro oral.

Foram descritos os mecanismos envolvidos no cancro oral relacionados com os microRNA's, nomeadamente a carcinogénese, a invasão celular e metastização, a prevenção do cancro oral, o diagnóstico precoce e o tratamento por terapia génica e sugere-se, ainda, que o conhecimento dos genes alvo dos microRNA's e as suas funções na malignização celular fornecem expectativas realísticas na prevenção precoce do cancro através do uso de medicamentos brevemente disponíveis no mercado. O grande desafio destes fármacos passa, tal como já referido, por conseguirem não incidir nas células normais do hospedeiro que ficam, deste modo, protegidas dos efeitos devastadores dos agentes citotóxicos convencionais. Em suma, existem já numerosos estudos que sugerem fortemente que os microRNA's desempenham um papel crucial e podem servir de biomarcadores de diagnóstico do carcinoma oral de células escamosas. Apesar das melhorias no conhecimento deste tipo de neoplasia maligna, os dados clínicos referentes a esta doença não têm sofrido melhorias significativas. Consequentemente é aqui proposta a realização de investigações mais detalhadas sobre os microRNA's, nomeadamente no que se refere:

- À relação entre microRNA's e entre microRNA's e outros genes;
- À alterações na expressão proteica induzida por microRNA's;
- À listagem de regiões específicas de expressão de microRNA's.

Estes enigmas devem ser resolvidos antes de se proceder a ensaios clínicos futuros para aplicações terapêuticas, de modo a que a segurança e saúde dos doentes com cancro oral seja assegurada.

Em Portugal, apela-se à crescente formação teórica, prática e ética dos médicos e médicos dentistas neste ramo de atuação clínica, para que os doentes possam ser devidamente reencaminhados para as unidades de saúde competentes e, portanto, corretamente acompanhados e tratados.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. McCarty M. **Discovering genes are made of DNA.** *Nature*. 2003 Jan 23;421(6921):406.
2. Prusiner SB, McCarty M. **Discovering DNA encodes heredity and prions are infectious proteins.** *Annual review of genetics*. 2006;40:25-45.
3. Dalmay T. **MicroRNAs and cancer.** *Journal of internal medicine*. 2008 Apr;263(4):366-75.
4. Kapranov P, St Laurent G. **Dark Matter RNA: Existence, Function, and Controversy.** *Frontiers in genetics*. 2012;3:60.
5. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. **The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14.** *Cell*. 1993 Dec 3;75(5):843-54.
6. Osada H, Takahashi T. **MicroRNAs in biological processes and carcinogenesis.** *Carcinogenesis*. 2007 Jan;28(1):2-12.
7. Dalmay T, Edwards DR. **MicroRNAs and the hallmarks of cancer.** *Oncogene*. 2006 Oct 9;25(46):6170-5.
8. Bartel DP. **MicroRNAs: target recognition and regulatory functions.** *Cell*. 2009 Jan 23;136(2):215-33.
9. Liu CJ, Kao SY, Tu HF, Tsai MM, Chang KW, Lin SC. **Increase of microRNA miR-31 level in plasma could be a potential marker of oral cancer.** *Oral diseases*. 2010 May;16(4):360-4.
10. Chang KW, Liu CJ, Chu TH, Cheng HW, Hung PS, Hu WY, et al. **Association between high miR-211 microRNA expression and the poor prognosis of oral carcinoma.** *Journal of dental research*. 2008 Nov;87(11):1063-8.
11. Chang SS, Jiang WW, Smith I, Poeta LM, Begum S, Glazer C, et al. **MicroRNA alterations in head and neck squamous cell carcinoma.** *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2008 Dec 15;123(12):2791-7.
12. Wong TS, Liu XB, Wong BY, Ng RW, Yuen AP, Wei WI. **Mature miR-184 as Potential Oncogenic microRNA of Squamous Cell Carcinoma of Tongue.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2008 May 1;14(9):2588-92.
13. Liu CJ, Lin SC, Yang CC, Cheng HW, Chang KW. **Exploiting salivary miR-31 as a clinical biomarker of oral squamous cell carcinoma.** *Head & neck*. 2012 Feb;34(2):219-24.
14. JN. "Novos hábitos sexuais" aumentam número de jovens com cancro oral: [http://www.jn.pt/PaginaInicial/Sociedade/Interior.aspx?content\\_id=1775739&page=-1](http://www.jn.pt/PaginaInicial/Sociedade/Interior.aspx?content_id=1775739&page=-1); 2011.
15. Ambros V. **Control of developmental timing in Caenorhabditis elegans.** *Current opinion in genetics & development*. 2000 Aug;10(4):428-33.
16. Carrington JC, Ambros V. **Role of microRNAs in plant and animal development.** *Science*. 2003 Jul 18;301(5631):336-8.
17. Bartel DP. **MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function.** *Cell*. 2004 Jan 23;116(2):281-97.
18. Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. **Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units.** *Genome research*. 2004 Oct;14(10A):1902-10.
19. Tarver JE, Donoghue PC, Peterson KJ. **Do miRNAs have a deep evolutionary history?** *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 2012 Oct;34(10):857-66.
20. Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ. **miRBase: tools for microRNA genomics.** *Nucleic acids research*. 2008 Jan;36(Database issue):D154-8.
21. Meyers BC, Souret FF, Lu C, Green PJ. **Sweating the small stuff: microRNA discovery in plants.** *Current opinion in biotechnology*. 2006 Apr;17(2):139-46.
22. Pfeffer S, Lagos-Quintana M, Tuschl T. **Cloning of small RNA molecules.** *Current protocols in molecular biology / edited by Frederick M Ausubel [et al]*. 2005 Nov;Chapter 26:Unit 26 4.
23. Cummins JM, Velculescu VE. **Implications of micro-RNA profiling for cancer diagnosis.** *Oncogene*. 2006 Oct 9;25(46):6220-7.

24. Shendure J, Ji H. **Next-generation DNA sequencing.** *Nature biotechnology.* 2008 Oct;26(10):1135-45.
25. Griffiths-Jones S. **miRBase: the microRNA sequence database.** *Methods in molecular biology.* 2006;342:129-38.
26. Almeida MI, Reis RM, Calin GA. **MicroRNA history: discovery, recent applications, and next frontiers.** *Mutation research.* 2011 Dec 1;717(1-2):1-8.
27. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, et al. **MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II.** *The EMBO journal.* 2004 Oct 13;23(20):4051-60.
28. Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. **An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells.** *Nature.* 2000 Mar 16;404(6775):293-6.
29. Esau C, Davis S, Murray SF, Yu XX, Pandey SK, Pear M, et al. **miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting.** *Cell metabolism.* 2006 Feb;3(2):87-98.
30. Krutzfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, et al. **Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'.** *Nature.* 2005 Dec 1;438(7068):685-9.
31. Mann DL. **MicroRNAs and the failing heart.** *The New England journal of medicine.* 2007 Jun 21;356(25):2644-5.
32. Chang TC, Mendell JT. **microRNAs in vertebrate physiology and human disease.** *Annual review of genomics and human genetics.* 2007;8:215-39.
33. Wienholds E, Kloosterman WP, Miska E, Alvarez-Saavedra E, Berezikov E, de Bruijn E, et al. **MicroRNA expression in zebrafish embryonic development.** *Science.* 2005 Jul 8;309(5732):310-1.
34. Wheeler G, Ntounia-Fousara S, Granda B, Rathjen T, Dalmay T. **Identification of new central nervous system specific mouse microRNAs.** *FEBS letters.* 2006 Apr 17;580(9):2195-200.
35. Darnell DK, Kaur S, Stanislaw S, Konieczka JH, Yatskievych TA, Antin PB. **MicroRNA expression during chick embryo development.** *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists.* 2006 Nov;235(11):3156-65.
36. Chen JF, Mandel EM, Thomson JM, Wu Q, Callis TE, Hammond SM, et al. **The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation.** *Nature genetics.* 2006 Feb;38(2):228-33.
37. Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J, Kuwajima S, Ma X, Macdonald PE, et al. **A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion.** *Nature.* 2004 Nov 11;432(7014):226-30.
38. Esau C, Kang X, Peralta E, Hanson E, Marcusson EG, Ravichandran LV, et al. **MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation.** *The Journal of biological chemistry.* 2004 Dec 10;279(50):52361-5.
39. Cao X, Pfaff SL, Gage FH. **A functional study of miR-124 in the developing neural tube.** *Genes & development.* 2007 Mar 1;21(5):531-6.
40. Schratt GM, Tuebing F, Nigh EA, Kane CG, Sabatini ME, Kiebler M, et al. **A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development.** *Nature.* 2006 Jan 19;439(7074):283-9.
41. Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP. **MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation.** *Science.* 2004 Jan 2;303(5654):83-6.
42. Iorio MV, Croce CM. **MicroRNAs in cancer: small molecules with a huge impact.** *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2009 Dec 1;27(34):5848-56.
43. Petersen PE. **Oral cancer prevention and control--the approach of the World Health Organization.** *Oral oncology.* 2009 Apr-May;45(4-5):454-60.
44. Warnakulasuriya S. **Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer.** *Oral oncology.* 2009 Apr-May;45(4-5):309-16.
45. Gupta B, Ariyawardana A, Johnson NW. **Oral cancer in India continues in epidemic proportions: evidence base and policy initiatives.** *International dental journal.* 2013 Feb;63(1):12-25.
46. Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Storm H. **Cancer Incidence in Five Continents.** *CancerBase No7, Lyon.* 2005;I to VIII.
47. Wunsch-Filho V, de Camargo EA. **The burden of mouth cancer in Latin America and the Caribbean: epidemiologic issues.** *Seminars in oncology.* 2001 Apr;28(2):158-68.

48. Sugerman PB, Savage NW. **Oral cancer in Australia: 1983-1996.** *Australian dental journal*. 2002 Mar;47(1):45-56.
49. UK C. Cancer Incidence Statistics <http://www.cancerresearchuk.org/cancer-info/cancerstats/incidence/2012>.
50. Sant M, Allemani C, Santaquilani M. **Survival of cancer patients diagnosed in 1995-1999. Results and commentary.** *European journal of cancer*. 2009;45: 931-991.
51. Santos L, Teixeira L. **Oncologia Oral.** Lidel. 2011.
52. Pinheiro P, Tyczynski J, Bray F, amado J, Matos E, Miranda A, et al. **Cancer in Portugal. IARC Technical Publication nº38, Lyon.** 2002.
53. Monteiro LS, Antunes L, Bento MJ, Warnakulasuriya S. **Incidence rates and trends of lip, oral and oro-pharyngeal cancers in Portugal.** *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*. 2012 Oct 4.
54. Kumar B, Cordell KG, Lee JS, Worden FP, Prince ME, Tran HH, et al. **EGFR, p16, HPV Titer, Bcl-xL and p53, sex, and smoking as indicators of response to therapy and survival in oropharyngeal cancer.** *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008 Jul 1;26(19):3128-37.
55. Galbiatti AL, Padovani-Junior JA, Maniglia JV, Rodrigues CD, Pavarino EC, Goloni-Bertollo EM. **Head and neck cancer: causes, prevention and treatment.** *Brazilian journal of otorhinolaryngology*. 2013 Apr;79(2):239-47. Cancer de cabeça e pescoco: causas, prevencao e tratamento.
56. Koppikar P, deVilliers EM, Mulherkar R. **Identification of human papillomaviruses in tumors of the oral cavity in an Indian community.** *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2005 Mar 1;113(6):946-50.
57. Soares CP, Malavazi I, dos Reis RI, Neves KA, Zuanon JA, Benatti Neto C, et al. **[Presence of human papillomavirus in malignant oral lesions].** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2002 Sep-Oct;35(5):439-44. Presenca do papilomavirus humano em lesoes malignas de mucosa oral.
58. Miller CS, Johnstone BM. **Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis, 1982-1997.** *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 2001 Jun;91(6):622-35.
59. Meurman JH. **Infectious and dietary risk factors of oral cancer.** *Oral oncology*. 2010 Jun;46(6):411-3.
60. McMichael AJ. **Food, nutrition, physical activity and cancer prevention. Authoritative report from World Cancer Research Fund provides global update.** *Public health nutrition*. 2008 Jul;11(7):762-3.
61. Piemonte ED, Lazos JP, Brunotto M. **Relationship between chronic trauma of the oral mucosa, oral potentially malignant disorders and oral cancer.** *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*. 2010 Aug 1;39(7):513-7.
62. Su FH, Chang SN, Chen PC, Sung FC, Huang SF, Chiou HY, et al. **Positive association between hepatitis C infection and oral cavity cancer: a nationwide population-based cohort study in Taiwan.** *PloS one*. 2012;7(10):e48109.
63. Upile T, Jerjes W, Al-Khawalde M, Radhi H, Sudhoff H. **Oral sex, cancer and death: sexually transmitted cancers.** *Head & neck oncology*. 2012;4:31.
64. Saini R. **Oral sex and oral cancer: A virus link.** *Journal of pharmacy & bioallied sciences*. 2011 Jul;3(3):467-8.
65. Ragin C, Edwards R, Larkins-Pettigrew M, Taioli E, Eckstein S, Thurman N, et al. **Oral HPV Infection and Sexuality: A Cross-Sectional Study in Women.** *International journal of molecular sciences*. 2011;12(6):3928-40.
66. Field JK. **Oncogenes and tumour-suppressor genes in squamous cell carcinoma of the head and neck.** *European journal of cancer Part B, Oral oncology*. 1992 Jul;28B(1):67-76.

67. Vogelstein B, Kinzler KW. **The multistep nature of cancer.** Trends in genetics : TIG. 1993 Apr;9(4):138-41.
68. Renan MJ. **How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data.** Molecular carcinogenesis. 1993;7(3):139-46.
69. Bishop JM. **Molecular themes in oncogenesis.** Cell. 1991 Jan 25;64(2):235-48.
70. Scully C. **Oncogenes, onco-suppressors, carcinogenesis and oral cancer.** British dental journal. 1992 Jul 25;173(2):53-9.
71. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, et al. **MicroRNA expression profiles classify human cancers.** Nature. 2005 Jun 9;435(7043):834-8.
72. Chu YH, Tzeng SL, Lin CW, Chien MH, Chen MK, Yang SF. **Impacts of microRNA gene polymorphisms on the susceptibility of environmental factors leading to carcinogenesis in oral cancer.** PloS one. 2012;7(6):e39777.
73. Uesugi A, Kozaki K, Tsuruta T, Furuta M, Morita K, Imoto I, et al. **The tumor suppressive microRNA miR-218 targets the mTOR component Rictor and inhibits AKT phosphorylation in oral cancer.** Cancer research. 2011 Sep 1;71(17):5765-78.
74. Cervigne NK, Reis PP, Machado J, Sadikovic B, Bradley G, Galloni NN, et al. **Identification of a microRNA signature associated with progression of leukoplakia to oral carcinoma.** Human molecular genetics. 2009 Dec 15;18(24):4818-29.
75. Nicolas FE, Lopez-Gomollon S, Lopez-Martinez AF, Dalmay T. **Silencing human cancer: identification and uses of microRNAs.** Recent patents on anti-cancer drug discovery. 2011 Jan;6(1):94-105.
76. Pilot H. **Pathway of carcinogenesis-genetic and epigenetic.** In multi stage carcinogenesis. 1992:21-33.
77. Khan M, Michu M, Imam S. **Current Molecular Concept of Oral Carcinogenesis and Invasion.** Medicine Today. 2010;22.
78. Yokota J, Sugimura T. **Multiple steps in carcinogenesis involving alterations of multiple tumor suppressor genes.** FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 1993 Jul;7(10):920-5.
79. Hida K, Shindoh M, Yasuda M, Hanzawa M, Funaoka K, Kohgo T, et al. **Antisense E1AF transfection restrains oral cancer invasion by reducing matrix metalloproteinase activities.** The American journal of pathology. 1997 Jun;150(6):2125-32.
80. Shindoh M, Higashino F, Kaya M, Yasuda M, Funaoka K, Hanzawa M, et al. **Correlated expression of matrix metalloproteinases and ets family transcription factor E1A-F in invasive oral squamous-cell carcinoma-derived cell lines.** The American journal of pathology. 1996 Mar;148(3):693-700.
81. Khan MH, Yasuda M, Higashino F, Haque S, Kohgo T, Nakamura M, et al. **nm23-H1 suppresses invasion of oral squamous cell carcinoma-derived cell lines without modifying matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 expression.** The American journal of pathology. 2001 May;158(5):1785-91.
82. Calin GA, Croce CM. **MicroRNA signatures in human cancers.** Nature reviews Cancer. 2006 Nov;6(11):857-66.
83. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. **Oncomirs - microRNAs with a role in cancer.** Nature reviews Cancer. 2006 Apr;6(4):259-69.
84. Liu X, Yu J, Jiang L, Wang A, Shi F, Ye H, et al. **MicroRNA-222 regulates cell invasion by targeting matrix metalloproteinase 1 (MMP1) and manganese superoxide dismutase 2 (SOD2) in tongue squamous cell carcinoma cell lines.** Cancer genomics & proteomics. 2009 May-Jun;6(3):131-9.
85. Pal A, Melling G, Hinsley EE, Kabir TD, Colley HE, Murdoch C, et al. **Cigarette smoke condensate promotes pro-tumourigenic stromal-epithelial interactions by suppressing miR-145.** Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology. 2013 Apr;42(4):309-14.
86. Burbelo PD, Bayat A, Lebovitz EE, Iadarola MJ. **New technologies for studying the complexity of oral diseases.** Oral diseases. 2012 Mar;18(2):121-6.

87. Shiiba M, Katsuhiko U, Tanzawa H. **MicroRNAs in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC) and Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC).** *Cancers*. 2010;2:653-69.
88. Avissar M, Christensen BC, Kelsey KT, Marsit CJ. **MicroRNA expression ratio is predictive of head and neck squamous cell carcinoma.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2009 Apr 15;15(8):2850-5.
89. Childs G, Fazzari M, Kung G, Kawachi N, Brandwein-Gensler M, McLemore M, et al. **Low-level expression of microRNAs let-7d and miR-205 are prognostic markers of head and neck squamous cell carcinoma.** *The American journal of pathology*. 2009 Mar;174(3):736-45.
90. Zhang Y, Guo J, Li D, Xiao B, Miao Y, Jiang Z, et al. **Down-regulation of miR-31 expression in gastric cancer tissues and its clinical significance.** *Medical oncology*. 2010 Sep;27(3):685-9.
91. Patel RS, Jakymiw A, Yao B, Pauley BA, Carcamo WC, Katz J, et al. **High resolution of microRNA signatures in human whole saliva.** *Archives of oral biology*. 2011 Dec;56(12):1506-13.
92. Park NJ, Zhou H, Elashoff D, Henson BS, Kastratovic DA, Abemayor E, et al. **Salivary microRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2009 Sep 1;15(17):5473-7.
93. Hanson EK, Lubenow H, Ballantyne J. **Identification of forensically relevant body fluids using a panel of differentially expressed microRNAs.** *Analytical biochemistry*. 2009 Apr 15;387(2):303-14.
94. Michael A, Bajracharya SD, Yuen PS, Zhou H, Star RA, Illei GG, et al. **Exosomes from human saliva as a source of microRNA biomarkers.** *Oral diseases*. 2010 Jan;16(1):34-8.
95. Kumar SV, Hurteau GJ, Spivack SD. **Validity of messenger RNA expression analyses of human saliva.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2006 Sep 1;12(17):5033-9.
96. Palanisamy V, Sharma S, Deshpande A, Zhou H, Gimzewski J, Wong DT. **Nanostructural and transcriptomic analyses of human saliva derived exosomes.** *PloS one*. 2010;5(1):e8577.
97. Chang CC, Yang YJ, Li YJ, Chen ST, Lin BR, Wu TS, et al. **MicroRNA-17/20a functions to inhibit cell migration and can be used a prognostic marker in oral squamous cell carcinoma.** *Oral oncology*. 2013 Apr 17.
98. Garzon R, Calin GA, Croce CM. **MicroRNAs in Cancer.** *Annual review of medicine*. 2009;60:167-79.
99. Garzon R, Marcucci G. **Potential of microRNAs for cancer diagnostics, prognostication and therapy.** *Current opinion in oncology*. 2012 Nov;24(6):655-9.
100. Liu X, Chen Z, Yu J, Xia J, Zhou X. **MicroRNA profiling and head and neck cancer.** *Comparative and functional genomics*. 2009:837514.
101. Li J, Huang H, Sun L, Yang M, Pan C, Chen W, et al. **MiR-21 indicates poor prognosis in tongue squamous cell carcinomas as an apoptosis inhibitor.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2009 Jun 15;15(12):3998-4008.
102. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. **Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?** *Nature reviews Genetics*. 2008 Feb;9(2):102-14.
103. Garzon R, Marcucci G, Croce CM. **Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges.** *Nature reviews Drug discovery*. 2010 Oct;9(10):775-89.
104. Schoof CR, Botelho EL, Izzotti A, Vasques Ldos R. **MicroRNAs in cancer treatment and prognosis.** *American journal of cancer research*. 2012;2(4):414-33.
105. Li J, Liang S, Yu H, Zhang J, Ma D, Lu X. **An inhibitory effect of miR-22 on cell migration and invasion in ovarian cancer.** *Gynecologic oncology*. 2010 Dec;119(3):543-8.
106. Stenvang J, Petri A, Lindow M, Obad S, Kauppinen S. **Inhibition of microRNA function by anti-miR oligonucleotides.** *Silence*. 2012;3(1):1.
107. Li X, Zhang Y, Shi Y, Dong G, Liang J, Han Y, et al. **MicroRNA-107, an oncogene microRNA that regulates tumour invasion and metastasis by targeting DICER1 in gastric cancer.** *Journal of cellular and molecular medicine*. 2011 Sep;15(9):1887-95.
108. Kluiver J, Gibcus JH, Hettinga C, Adema A, Richter MK, Halsema N, et al. **Rapid generation of microRNA sponges for microRNA inhibition.** *PloS one*. 2012;7(1):e29275.

109. Lou Y, Yang X, Wang F, Cui Z, Huang Y. **MicroRNA-21 promotes the cell proliferation, invasion and migration abilities in ovarian epithelial carcinomas through inhibiting the expression of PTEN protein.** *International journal of molecular medicine*. 2010 Dec;26(6):819-27.
110. Small EM, Olson EN. **Pervasive roles of microRNAs in cardiovascular biology.** *Nature*. 2011 Jan 20;469(7330):336-42.
111. Rather MI, Nagashri MN, Swamy SS, Gopinath KS, Kumar A. **Oncogenic microRNA-155 down-regulates tumor suppressor CDC73 and promotes oral squamous cell carcinoma cell proliferation: implications for cancer therapeutics.** *The Journal of biological chemistry*. 2013 Jan 4;288(1):608-18.
112. Lanford RE, Hildebrandt-Eriksen ES, Petri A, Persson R, Lindow M, Munk ME, et al. **Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection.** *Science*. 2010 Jan 8;327(5962):198-201.

